



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

2012

PEDRO FILIPE

ALMEIDA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DE FACTORES LIMITANTES E PREDITIVOS DE ESTABILIDADE DE CERVEJA



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

2012

PEDRO FILIPE

ALMEIDA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DE FACTORES LIMITANTES E PREDITIVOS DE ESTABILIDADE DE CERVEJA

Relatório de Estágio / Tese de Mestrado

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Eng^a Beatriz Carvalho e do Dr. Tiago Brandão, do departamento de I&D do órgão de acolhimento de estágio, UNICER, Bebidas SA.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

o júri

presidente

Dr^a. Ivonne Delgadillo Giraldo

Professora Associada com Agregação, Departamento de Química
Universidade de Aveiro

ivonne@ua.pt

co-orientador

Dr. Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador Auxiliar, Departamento de Química

Universidade de Aveiro

jorgesaraiva@ua.pt

arguente

Dr^a. Elisabete Maria da Cruz Alexandre

Investigadora, Universidade Católica do Porto

elisabete.alexandre.pt@gmail.com

orientador de estágio

Dr. Tiago Luís Monteiro Brandão

Director de I&D , UNICER

Tiago.Brandao@unicer.pt

agradecimentos

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

À Universidade de Aveiro e à Unicer manifesto apreço pela possibilidade de realização do presente trabalho e por todos os meios colocados à disposição. Agradeço igualmente a excelência da formação prestada e conhecimentos transmitidos, que foram úteis para esta dissertação, ambicionando que esta dignifique, em última instância ambas as instituições.

Ao Professor Jorge Saraiva e Dr. Tiago Brandão, orientadores, pela disponibilidade, colaboração e conhecimentos transmitidos.

À forma amável, aberta e atenciosa como fui recebido na Unicer e pela disponibilidade em material de apoio e à possibilidade de explorar e por em prática as ideias que vão espontando. Reitero o meu agradecimento à Eng.^a Beatriz Carvalho pela constante disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas, o apoio incondicional, o valor dado que serve de incentivo para prosseguir sempre com ambição de mais e melhor e os conselhos para tornar valioso e recompensado o esforço dedicado a cada trabalho.

Ao núcleo de colaboradores da Inovação e Desenvolvimento, aos analistas do Laboratório central e restante pessoal do departamento de Controlo de Qualidade, à Produção e ao pessoal das linhas de enchimento, assistentes e estagiários. Um especial obrigado aos provadores que acompanharam semanalmente o projecto e sempre incentivaram para a sua prorrogação. A aquelas pessoas que passaram de colegas de trabalho a amigos com quem trabalho.

Aos amigos que estiveram ao meu lado nesta “caminhada” agradeço a força, a amizade e confiança que depositaram em mim.

Por último, manifesto um sentido e profundo reconhecimento à minha família, especialmente Pai e Mãe, pelo apoio incondicional ao longo destes anos, que fizeram esforços sobre-humanos para me apoiarem e a conseguir manter a minha ambição de querer sempre o melhor e desta forma poder retribuir-lhes demonstrando a gratidão que sinto pelas energias e tudo o resto que dispensaram por mim. Expresso sentimento idêntico em relação a todos os meus amigos de longa data.

A todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me afincadamente não vos desiludir. Muito obrigado...

palavras-chave

Cerveja; Pasteurização; Estabilidade; HPP; Parâmetros de qualidade.

resumo

Na sociedade actual, o consumidor procura cada vez mais produtos pouco processados, preferindo produtos frescos ou com características semelhantes, mas ao mesmo tempo que tenha um prazo de validade alargado e que se mantenha estável por um longo período de tempo.

Cerveja não pasteurizada é comercializada por todo mundo, especialmente por cervejarias de fabrico artesanal, e é considerada uma cerveja “viva”, por ainda conter leveduras vivas, com benefícios para a saúde como fonte natural de vitaminas, proteínas e com atributos conferidos pela presença de organismos probióticos.

A pasteurização elimina certas propriedades benéficas devido à destruição dos organismos vivos e desnaturação de enzimas e, devido às alterações químicas inerentes ao processamento térmico, o sabor e o aroma da cerveja também é alterado, perdendo-se a frescura característica de uma cerveja jovem, podendo o consumidor mais experiente detectar um sabor requeentado conferido pelo processo de pasteurização. No caso das grandes indústrias cervejeiras, a pasteurização é utilizada para se atingir um patamar de segurança de estabilidade microbiológica do produto, para que se mantenha a sua estabilidade durante todo o processo de distribuição, nacional e internacional, até ao consumidor final. A cerveja comercializada em grande escala sente imensas variações térmicas e certamente é sujeita a certos períodos de exposição à luz solar. Estes factores são as principais adversidades para as propriedades organolépticas próprias de uma cerveja fresca e de qualidade. Principalmente as variações térmicas têm influência no desenvolvimento microbiológico na cerveja, caso este não tenha sido estabilizado pelo processo de pasteurização. O objectivo do estágio na Unicer foi a avaliação da estabilidade da cerveja e do impacto da redução ou eliminação da pasteurização na bebida. A obtenção de estabilidade microbiológica também foi estudada por métodos alternativos de pasteurização não térmica, nomeadamente por pasteurização a alta pressão (HPP).

keywords

Beer; Pasteurization; Stability, HPP; Quality parameters

abstract

In modern society, consumers demand for fresh and less processed products, requesting at the same time, products with long shelf-life.

Non-pasteurized beer is sold all around the world, particularly in small breweries, and it's called "live" beer containing living micro-organisms such as yeast. The presence of living beings gives the beer special attributes, being a source of vitamins, proteins and all the benefits to health conferred by probiotic organisms.

Pasteurization withdraw some of those attributes due to living organisms destruction and enzyme denaturation and, due to chemical changes which occur during thermal process, taste and flavor of beer also is emended, losing the coolness of a young beer, being the pasteurization flavor detected by experienced consumer. Large scale breweries use pasteurization to obtain a homogenous product, microbiologically stable during all the distribution process, national and international, till the consumer. Large scale commercialized beer experience several thermal variations and it's certainly exposed to sun light. These factors are the main adversities to maintain the organoleptic properties of a quality fresh beer. Thermal variation is the most influent factor in the development of microorganisms in beer, if this hasn't been stabilized by pasteurization.

The main goal of the work developed in the internship at Unicer was to evaluate the stability of beer and measure the impact caused by the reduction or deletion of pasteurization in this beverage. Obtaining microbiological stability in beer was also studied using alternative non-thermal methods, such like high pressure pasteurization (HPP).

Índice

Notação e glossário	3
Introdução.....	4
Caracterização da Cerveja Lager.....	4
Composição típica e caracterização	4
A cerveja na indústria alimentar	5
Enquadramento e Apresentação do Projecto.....	6
Contributos do Trabalho.....	6
Estado da Arte	7
Envelhecimento da Cerveja.....	7
Pasteurização	8
Diversidade microbiológica e estabilidade da cerveja	12
Bactérias Gram-positivas	13
Bactérias Gram-negativas	14
Actividade antimicrobiana dos componentes do lúpulo.....	17
Leveduras	19
Tipos de Cerveja.....	21
Cerveja não pasteurizada e tendências de mercado	21
Controlo de Qualidade da Cerveja.....	24
Físico-Química	24
Auto Analisador Anton-Paar	24
Estabilidade da Espuma	29
Teor em CO ₂	30
Turvação	32
Amargor	33
Microbiologia	33
Filtração por membrana	33

Análise sensorial	34
Controlo Organoléptico	35
Teste Triangular	36
Descrição técnica e discussão dos resultados	37
Desenvolvimento Microbiológico	38
Análises Físico-químicas	42
Concentração de Etanol	43
Extracto Real (Er)	45
Grau de Fermentação (RDF)	46
Cor	48
pH	49
Estabilidade da Espuma	50
Turvação a 20°C	51
Concentração de CO ₂	52
Amargor ou teor em ácidos iso- α do lúpulo	54
Análise Sensorial	55
Conclusões	60
Avaliação do trabalho realizado	62
Objectivos Realizados	62
Limitações e trabalho futuro	62
Outros trabalhos Realizados	63
Avaliação do impacto da redução das UP em dois tipos de cerveja preta	63
Estudo da aplicação da tecnologia de HPP em cerveja	67
MPA - Métodos Preditivos de Análise	68
Apreciação Final	82
Referências Bibliográficas	83

Notação e glossário

UP - Unidades de Pasteurização

EBC - *European Brewery Convention*

LE - Limite de Especificação

LIE - Limite Inferior de Especificação

LSE - Limite Superior de Especificação

ADF - Atenuação Aparente

RDF - Atenuação Real

Er - Extrato Real

HPP - *High pressure pasteurization*

UFC - Unidades formadoras de colónias

TCF - Tanque de Cerveja Filtrada

CIP - *Cleaning in Place*

°P - Grau Plato

I&D - Inovação e Desenvolvimento

PCR - *Polymerase chain reaction*

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*

GC-MS - *Gas chromatography-mass spectrometry*

Introdução

Caracterização da Cerveja Lager

A cerveja é a bebida alcoólica mais antiga ¹ e mais consumida ² no mundo, e a terceira bebida mais comum a seguir à água e ao chá ³. É produzida através da fermentação de açúcares fermentescíveis, monómeros do amido, geralmente provenientes de grãos dos cereais, nomeadamente cevada maltada. Embora o trigo, o milho e o arroz também sejam amplamente utilizados. A maioria das cervejas são aromatizadas com lúpulo, que confere amargor e serve como um conservante natural, contudo, outros aromatizantes como ervas ou fruta podem ocasionalmente ser utilizados. O conteúdo de álcool na cerveja costuma rondar os 4-6% do volume total, mas pode variar entre <1% a >20% em alguns casos raros.

A cerveja do tipo Pilsener nasceu em Pils, na Tchécoslováquia, em 1842, e é a mais conhecida e consumida no mundo. Tipicamente é de cor clara e o sabor desta costuma ser suave e os produtores recomendam que se sirvam geladas, embora os vários exemplos de Pilsener em todo o mundo possam variar em sabor, cor e composição.

Composição típica e caracterização

Os principais ingredientes da cerveja são água; uma fonte de amido, tal como a cevada maltada, capaz de ser fermentada; uma levedura cervejeira para realizar a fermentação; e um aromatizante, tal como o lúpulo. Uma mistura com outro produto rico em amido pode ser usada com uma fonte de amido secundária, como o milho, o arroz ou o açúcar. Estes são normalmente chamados de adjuvantes, especialmente quando usados como um substituto mais barato da cevada maltada e para se conseguirem produzir mostos com maior extracto ⁴.

A cerveja pilsener é uma cerveja com uma cor levemente dourada, com uma textura muito atenuada e uma amargura característica do lúpulo. Estas lagers (cervejas de fermentação baixa) tendem a ser secas, leves, com um sabor limpo e tonificado (devido à acidez da carbonatação forçada). Os sabores devem ser suaves, sem que nenhum ingrediente tradicional da cerveja se sobreponha aos outros. Os atributos do lúpulo (amargor, sabor, e aroma) variam entre o negligenciável e uma amargura seca proveniente dos lúpulos nobres. Os ingredientes principais são água, malte Pilsener e lúpulo, embora alguns produtores utilizem adjuvantes como o arroz ou o milho para

clarear o corpo da cerveja. Tende a não haver nenhum sabor muito pronunciado a manteiga, típico do diacetilo.

A cerveja na indústria alimentar

Na indústria alimentar, a cerveja está posicionada num patamar de realce. Não é por acaso que tal facto acontece: A cerveja tem vindo a ganhar cada vez mais adeptos devido a importantes estudos científicos realizados recentemente que comprovam que a cerveja não tem efeitos nocivos para a saúde, se consumida moderadamente, bem pelo contrário, representa uma importante fonte de nutrientes que desempenham um importante papel na saúde e no bem-estar do consumidor.

Não só pelas suas características únicas, o consumidor acompanha uma tendência de consumo de produtos pouco processados e o mais naturais possíveis e por isso, a indústria cervejeira necessita de acompanhar as tendências de mercado, tentando satisfazer o consumidor comum e atrair novos adeptos. Desta forma, surgem cada vez mais marcas de cerveja artesanal que apresentam um produto pouco processado e com importante valor nutricional, referindo a presença de levedura fermentativa no produto acabado, como um microrganismo probiótico e como uma importante fonte de nutrientes, para além do teor proteico mais elevado devido à inexistência de uma fase de filtração.

A comercialização de cerveja artesanal é possível em pequena escala devido às características únicas da cerveja, que conjuga uma variedade de compostos que constituem uma barreira ao desenvolvimento e a propagação de microrganismos no interior da embalagem comercializada.

Devido à necessidade de corresponder ao mercado interno e externo em grande escala e, simultaneamente, cumprir as normas de segurança alimentar impostas, a cerveja comercializada pela Unicer sofre um processo de pasteurização térmica, que visa inviabilizar o desenvolvimento dos microrganismos que ainda podem estar presentes no produto final e potencialmente serem capazes de o deteriorar.

Enquadramento e Apresentação do Projecto

No âmbito do estágio na Unicer, o projecto NUP foi desenvolvido com o intuito de avaliar os factores limitantes e preditivos da estabilidade de um tipo específico de cerveja. Deste modo, os principais objectivos do trabalho foram:

- Definir a shelf-life de um tipo de cerveja não pasteurizada;
- Avaliação do desenvolvimento de microrganismo na cerveja;
- Identificação dos microrganismos presentes no processo industrial e remanescentes até ao produto final, antes do processo de pasteurização;
- Avaliação do impacto da remoção do processo de pasteurização no perfil organoléptico e nas características físico-químicas da cerveja.

Para além do projecto NUP, surgiu a possibilidade de enquadramento em novos projectos do departamento de I&D da Unicer, sendo estes descritos mais adiante.

Contributos do Trabalho

Com o trabalho desenvolvido e com base nos resultados obtidos, foi possível caracterizar este tipo de cerveja em específico, testando através dos métodos de controlo de qualidade de cerveja definidos por lei, o impacto da exclusão de um processo de estabilização utilizado de forma rotineira na produção industrial da cerveja, nomeadamente a pasteurização em túnel.

Com os resultados obtidos podemos assegurar que se forma um ambiente bacteriostático dentro da garrafa de cerveja não pasteurizada, constituindo um importante passo no conhecimento deste produto em específico e valer-se do estudo como ponto de partida para uma potencial redução das UP aplicadas actualmente neste tipo de cerveja e no desenvolvimento de métodos alternativos de estabilização microbológica, com menos impacto ambiental e económico e também com menor impacto no perfil sensorial da cerveja.

Estado da Arte

Envelhecimento da Cerveja

Durante o armazenamento da cerveja ocorrem diversas alterações na sua composição química, normalmente associadas à alteração das propriedades sensoriais. Normalmente, o envelhecimento da cerveja é considerado negativo para a sua qualidade apesar de haver estudos que revelam que os sabores associados à sua maturação não são necessariamente considerados *off flavours*.⁵

Na literatura existem poucas referências sobre o desenvolvimento de sabores associados ao envelhecimento da cerveja especialmente devido ao facto de existirem milhares de tipos de cerveja em todo mundo e cada uma delas tem a sua forma específica de maturação. De um modo geral, o gráfico em baixo descreve a alteração das propriedades sensoriais deste tipo de bebida.⁶

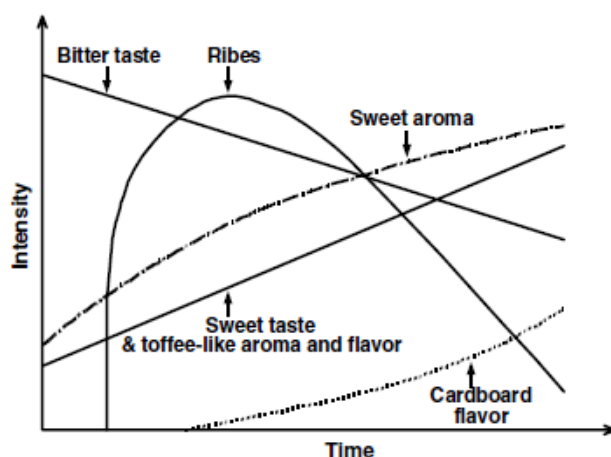


Figura 1 - Alterações sensoriais durante o envelhecimento da cerveja.

A deterioração do sabor é resultado quer de reacções de síntese quer de reacções de degradação. A formação de moléculas, em concentrações superiores ao seu limiar de detecção sensorial, provoca a sensação de novos sabores enquanto que a degradação de algumas moléculas leva à perda dos sabores associados à frescura da cerveja.⁷

O mecanismo das reacções pode ser explicado pelo facto de que os constituintes da cerveja fresca e engarrafada não estão em equilíbrio químico. Termodinamicamente, uma garrafa de cerveja é um sistema que vai tender para um estado de energia mínimo e de máxima entropia. Consequentemente as moléculas são sujeitas a diversas reacções durante o armazenamento que irão determinar o tipo de envelhecimento que a cerveja vai sofrer.⁸

As reacções mais frequentes são as das espécies reactivas de oxigénio, que reagem com a maioria das moléculas orgânicas como por exemplo polifenóis, isohumulonas e

álcoois; de síntese de compostos carbonílicos, entre eles oxidação de álcoois de cadeia longa e consequente formação de aldeídos; degradação de Strecker dos aminoácidos, degradação dos ácidos do lúpulo, oxidação de ácidos gordos e reacções de Maillard.⁸

Embora muitas conversões sejam termodinamicamente possíveis, a sua relevância para o envelhecimento da cerveja é determinada pelas condições de armazenamento, ou seja, temperatura, luz, variação térmica, etc; pela concentração de substrato disponível, pela concentração de oxigénio dentro da garrafa e pela estabilidade microbiológica da cerveja.⁸

Normalmente, a estabilidade biológica da cerveja é conseguida através da sua pasteurização através de calor, apesar de estar associado a este processo um sabor denominado de “sabor de pasteurização” que retira a frescura da bebida.^{8,9} Estudos revelam que a deterioração do sabor devido ao processo de pasteurização apenas é detectável com um tratamento de 80 ou mais unidades de pasteurização com temperaturas superiores a 62 °C.^{9,10} Existem outros processos de estabilização não térmicos nomeadamente microfiltração, por irradiação e por alta-pressão (HPP).

Pasteurização

O objectivo da pasteurização é prolongar o prazo de validade da cerveja através da inactivação de todos os microrganismos capazes de crescer nessas condições e de desnaturar enzimas que poderão provocar alterações químicas indesejáveis. Este propósito é conseguido através da exposição da cerveja a uma temperatura moderada durante um determinado espaço de tempo. A duração do tratamento é inversamente proporcional à temperatura máxima do processo. A inactivação dos microrganismos é intensificada pela presença de compostos antimicrobianos naturais, concretamente iões de hidrogénio (pH baixo), etanol, dióxido de carbono e certos componentes do lúpulo. Se um destes for excluído, por exemplo, nas cervejas sem álcool, o tratamento térmico tem de ser aumentado.¹¹⁻¹³ É importante atingir-se um grau suficientemente alto de inactivação de microrganismos. Ao mesmo tempo, os efeitos do aquecimento na qualidade sensorial da cerveja bem como os custos associados à pasteurização devem ser minimizados. Por isso é necessário optimizar o tratamento térmico em cada tipo de cerveja. Desta forma e tendo em conta esses factores, a pasteurização permite atingir um patamar em que a cerveja é estável, isto porque há microrganismos capazes de resistir à pasteurização, como por exemplo os esporos, mas que são incapazes de crescer na cerveja.¹²

Como a cerveja é um produto alimentar especialmente fabricado a partir da actividade conjunta de microrganismos e a partir de matérias-primas naturais, a diversidade microbiológica da mesma é bastante elevada. Por este motivo, o controlo microbiológico é feito baseado em Unidades de Pasteurização (UP).¹¹⁻¹³

A escolha das UP a que a cerveja é sujeita é baseada num termo geralmente utilizado em microbiologia alimentar que define o tempo necessário para se inactivar 90 % da população viável do microrganismo, a uma determinada temperatura. Este termo denomina-se D-value e é característico de cada espécie de microrganismos. O Z-value é outro termo utilizado que por sua vez define o aumento da temperatura necessário para que haja uma diminuição de 90% do D-value, ou seja o aumento de temperatura necessário para que a inactivação seja 10 vezes mais eficiente. O Z-value é igualmente característico da espécie.^{11,12}

O cálculo do impacto do processamento é então calculado a partir da equação da taxa de letalidade, L.

$$L = 10^{\left(\frac{T-T_0}{Z}\right)}$$

Onde,

T_0 é a temperatura de referência

T é a temperatura medida

Z é o Z-value do microrganismo

No caso da indústria cervejeira, e segundo o manual de boas práticas relativo à pasteurização de cerveja imposto pela *European Brewery Convention*¹¹, devido à diversidade microbiológica deste tipo de bebida, a temperatura de referência é de 60 °C e o Z-value estabelecido é de 6,94 °C. Este valor foi obtido através um estudo realizado por Del Vecchio em organismos nocivos à cerveja¹⁴. Dividindo o total de UP com o D_{60} -value do microrganismo mais resistente (ou mais “crítico”), obtemos o valor do factor de inactivação logarítmica para esse organismo. Segundo o manual de boas o manual de boas práticas da *EBC*, o Z-value de 6,94 °C é válido para este tipo de bebida.¹¹ (ver tabela em anexo dos valores de D_{60} e Z para alguns microrganismos nocivos da cerveja e algumas estirpes de leveduras fermentativas)

Sendo um processo contínuo, a pasteurização é realizada ao longo do túnel de pasteurização, num processo que demora aproximadamente uma hora. Na figura em baixo representada podemos observar o corte transversal de um pasteurizador em túnel e os diferentes *set points* dos seus segmentos (figura 2). Por este motivo, é

necessário calcular o impacto do processamento num dado intervalo de tempo. No túnel de pasteurização, a cerveja é sujeita a diferentes temperaturas consoante o local em que se encontra. Para calcular o total de UP a que a cerveja foi sujeita, o *logger* adaptado à garrafa mede a temperatura atingida no *cold spot* de 10 em 10 segundos durante todo o processo e memoriza-a. Podemos ver a sua representação nas seguintes figuras (figuras 3,4 e 5)

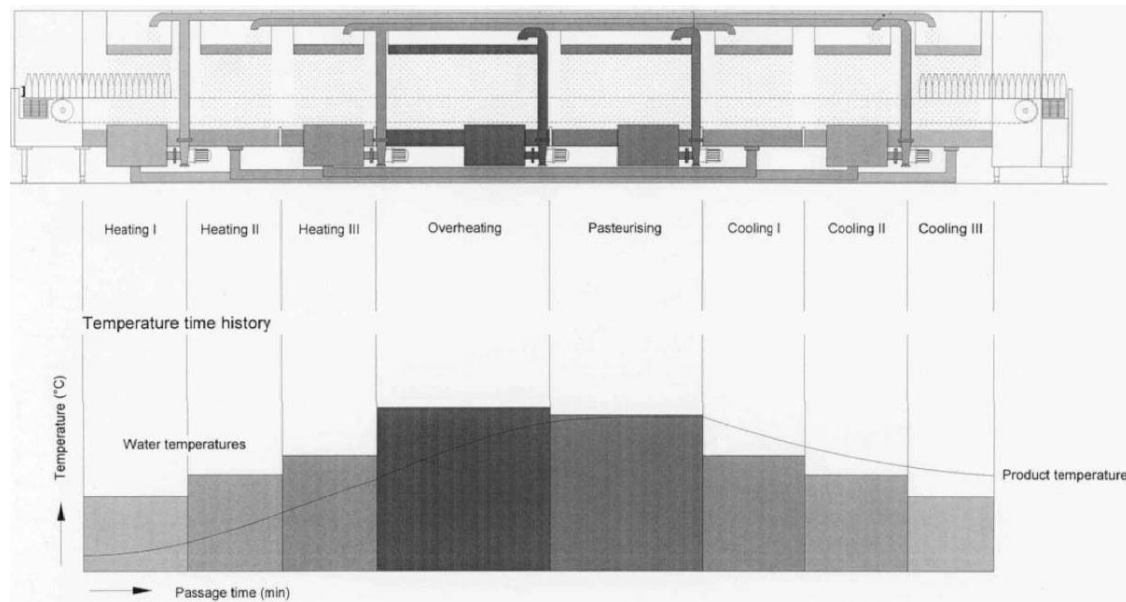


Figura 2- Representação do túnel de pasteurização e histórico do tempo-temperatura.¹¹



Figura 3 - Adaptação do logger à garrafa para medição da temperatura no *cold spot*.

Desta forma, efectua-se o somatório das medições da taxa de letalidade de todo o processo, considerando o valor obtido as UP a que a cerveja foi sujeita:

$$UP = \sum_0^t L dt$$

A equação simplificada, considerando os valores pré estabelecidos por lei de $T_0 = 60$ °C e $Z = 6,94$ °C, obtém-se:

$$UP = \sum_0^t 1,393^{(T-60)} dt$$

Onde,

T corresponde à temperatura no *cold spot*

Estudos referem que as leveduras fermentativas e *Pediococcus sp.* necessitam apenas de tratamento térmico correspondente a 1UP para se atingir estabilidade biológica satisfatória neste tipo de bebida. No caso do *Lactobacillus sp.*, as UP necessárias são de aproximadamente de 5 e para as leveduras selvagens, acima de 10 UP.¹¹ De forma a garantir uma margem de segurança maior são utilizadas UP mais elevadas. Por exemplo, 15 UP são o mínimo aceitável para a cerveja em estudo. No caso de cerveja com baixo teor de álcool ou desalcoholizada e de cerveja com elevado teor de açúcares fermentescíveis o mínimo de UP a que a cerveja é sujeita é de 80.

Durante o processo de pasteurização em túnel, o aquecimento e arrefecimento da cerveja ocorre através das paredes da garrafa. A transferência de calor até ao produto consiste numa combinação de transferência de calor convectivo desde o spray de água até à garrafa, condução através da das paredes da garrafa e por convecção das paredes da garrafa até à cerveja contida no seu interior. A convecção é resultado das diferenças de densidade geradas pelas diferentes temperaturas a que o produto se encontra na mesma altura mas em zonas diferentes da garrafa. Por este motivo, existe um local perto do fundo da garrafa, no seu centro transversal, que é o último a sofrer os efeitos provocados pelo calor. Este local é conhecido como o *cold spot* e é o que tem de ser considerado quando se efectuam os testes do mínimo de UP. Por esse motivo, a sonda do Logger efectua a medição e registo da temperatura da cerveja nesse mesmo ponto, ao longo do processo de pasteurização.^{9,11}



Figura 4- Logger adaptado à garrafa para medição da temperatura no *cold spot*.

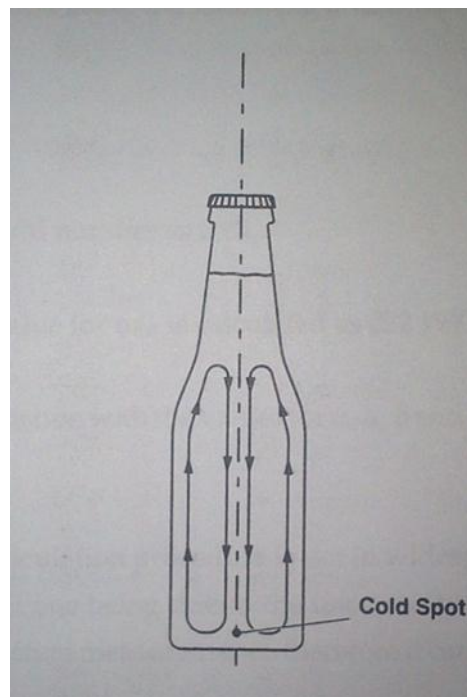


Figura 5 - Representação do *cold spot* da garrafa e das correntes convectivas do fluido.¹¹

Diversidade microbiológica e estabilidade da cerveja

A cerveja constitui um meio pouco favorável ao desenvolvimento de microrganismos devido à presença de etanol (0,5-10% m/m), componentes provenientes do lúpulo (aproximadamente 17-55 ppm de ácido iso- α) que são especialmente tóxicos para as bactérias gram-positivas, alto teor de CO_2 (cerca de 0,5 % m/v), pH baixo (3,8 a 4,7), concentração de O_2 reduzida (<0,1 ppm) e a presença de apenas alguns vestígios de compostos nutritivos como glucose, maltose e maltotriose. Estes compostos, fontes de carbono, foram substratos para as leveduras durante a fermentação e por isso, em princípio, já não se encontram na cerveja após a fase da fermentação.

Apesar do ambiente inóspito, alguns microrganismos conseguem desenvolver-se na cerveja. Os microrganismos frequentemente presentes na cerveja e considerados nocivos para a bebida são bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras selvagens.

Bactérias Gram-positivas

As bactérias gram-positivas nocivas à cerveja incluem bactérias produtoras de ácido láctico pertencente aos géneros *Lactobacilli* e *Pediococci*. Este tipo de bactérias deteriora a cerveja por produzir sabores desagradáveis, por exemplo a suor, e um odor atípico. A turvação provocada por este tipo de bactérias também é um factor inaceitável.^{12,13,15}

Lactobacilli

O género *Lactobacilli* é o maior género de bactérias produtoras de ácido láctico e inclui numerosas espécies. Várias espécies deste género são utilizadas para diversos processos fermentativos, incluindo de produtos alimentares, desde cerveja, vinho, iogurte e *pickles*. Apenas algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de deteriorar a cerveja, sendo a de maior realce a espécie *L. brevis*, por estar presente com bastante frequência na cerveja e em praticamente todo o processo de produção. *L. brevis* é uma espécie de bactéria obrigatoriamente heterofermentativa e é das espécies nocivas à cerveja mais estudadas. Tem crescimento óptimo a 30°C e em pH 4-6 e é geralmente resistente aos componentes do lúpulo e por ser fisiologicamente versátil, pode causar problemas na cerveja como super-atenuação, pela capacidade de fermentar dextrinas e amido. Apesar de ser uma bactéria gram-positiva, é altamente resistente aos componentes do lúpulo, sendo o mecanismo explicado mais à frente.

Outro *Lactobacillus* responsável pela deterioração de cerveja é o *L. lindneri*. Esta espécie é fisiologicamente muito semelhante à *L. brevis* e possui igualmente um mecanismo de resistência ao poder bacteriostático dos componentes do lúpulo. Esta espécie tem crescimento óptimo 19-23 °C e é especialmente problemática porque cresce muito lentamente em meios de cultura como o UBA, mas na cerveja o seu desenvolvimento pode ser bastante rápido.^{12,15}

Outras espécies menos comuns são *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryneformis*, *L. curvatus* e *L. plantarum*. Dentro destas espécies, a mais problemática é a *Lb. casei* devido ao facto de conseguir produzir diacetilo que confere à cerveja um sabor inaceitável a manteiga rançosa. O diacetilo aparenta ser um produto mais forte em termos sensoriais do que o ácido láctico, produto principal da fermentação realizada pelas bactérias lácticas, pelo facto de o valor do limiar de detecção do diacetilo na cerveja ser muito inferior (0,15 ppm) ao do ácido láctico (300 ppm). O diacetilo também é produzido durante a fermentação do mosto pelas leveduras e níveis demasiado altos

de diacetilo são produzidos quando as leveduras não são removidas devidamente no fim da fermentação.¹⁵

Pediococci

O género *Pediococci* inclui bactérias homofermentativas capazes de deteriorar a cerveja pela formação de ácido e do diacetilo, que confere um aroma amanteigado característico, para além de ser capaz de turvar a cerveja. Bactérias desta espécie são encontradas em diversos estágios do processo, desde o mosto até à cerveja, nomeadamente *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* e *P. pentosaceus*. Apesar de poderem estar presentes na cerveja, nem todas as espécies são capazes de produzir danos à cerveja. Dentro destas espécies, a que requer maior atenção é o *Pediococcus damnosus* pelo facto de ser resistente aos componentes do lúpulo e produzir elevadas quantidades de diacetilo. O desenvolvimento tecnológico e sanitário tem demonstrado ser importante no controlo deste tipo de bactéria, tendo-se reduzido drasticamente os incidentes relacionados com esta espécie nas últimas décadas. Para além do *P. damnosus*, apenas as espécies *P. inopinatus* e *P. dextrinicus* podem apresentar um risco para a cerveja mas apenas se conseguem desenvolver com pH superior a 4,2 e em baixas concentrações de etanol e componentes do lúpulo, para além de não serem produtores de diacetilo.^{12,13,15}

Além das espécies *Lactobacillus* e *Pediococcus*, outras bactérias gram-positivas são ocasionalmente responsáveis por deteriorarem a cerveja. Há registo de bactérias da espécie *Micrococcus kristinae* se conseguirem desenvolver na cerveja a baixa concentração de etanol e componentes do lúpulo a valores de pH superiores a 4,5. Normalmente os *Micrococci* são estritamente aeróbicos, mas a espécie *M. kristinae* consegue crescer sob condições anaeróbicas e resultado do seu metabolismo confere um aroma frutado atípico à cerveja.¹⁵

Bactérias Gram-negativas

Vários géneros de bactérias gram-negativas são conhecidos por estarem envolvidos na deterioração da cerveja. Este tipo de bactérias é especialmente problemático devido ao facto de possuir uma membrana exterior hidrofóbica que lhe confere resistência aos componentes do lúpulo. As bactérias aeróbicas produtoras de ácido acético, por exemplo *Gluconobacter* e *Acetobacter* spp. são conhecidas por causar danos à cerveja, mas a deterioração causada por estas espécies tem decrescido significativamente nas indústrias modernas devido à redução da concentração de

oxigénio durante os processos de produção e no produto acabado. Em contrapartida, a ocorrência de deterioração de cerveja provocada por bactérias estritamente anaeróbicas aumentou. As espécies *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Zymomonas* e *Zymophilus* estão incluídas neste grupo, sendo especialmente as bactérias das espécies *Pectinatus* e *Megasphaera* as mais problemáticas por serem capazes de produzir um odor repulsivo a ovo podre na cerveja.¹⁵

Pectinatus

Pectinatus spp. é conhecido por ser uma das espécies de bactérias deteriorantes mais perigosas para a cerveja, especialmente em cerveja não pasteurizada. Estas bactérias conseguem desenvolver-se num intervalo de temperatura compreendido entre 15 e 40 °C, com crescimento óptimo à volta de 32 °C, com pH entre 3.5 e 6, tendo crescimento óptimo a pH 4.5 e num meio contendo 4.5% (m/v) de etanol. Durante o seu crescimento, quantidades consideráveis de ácido propiónico e acético são produzidas, bem como ácido sucínico e láctico e acetoína. As bactérias desta espécie também são capazes de fermentar ácido láctico. As principais adversidades para a cerveja provocadas por este tipo de bactéria são a elevada turvação e o odor a ovo podre pela combinação de vários ácidos gordos, sulfureto de hidrogénio e metil mercaptano (metanotiol).^{12,13}

Megasphaera

O género *Megasphaera* inclui duas espécies capazes de trazer problemas para o fabrico de cerveja, *M. elsdeni* e *M. cerevisiae*. *M. cerevisiae* cresce num intervalo entre 15 e 37 °C tendo crescimento óptimo a 28 °C e com pH superior a 4.1 e seu crescimento é inibido em concentrações de etanol superiores a 2.8 (m/v). Estudos referem que esta é a espécie, do grupo das anaeróbicas, mais presente no processo de produção de cerveja. A deterioração causada por esta espécie é caracterizada por uma turvação excessiva, como no caso da contaminação por *Pectinatus* e pela produção de quantidades consideráveis de ácido butírico juntamente com ácidos acético, isovalérico, valérico e caprílico bem como acetoína. Tal como os *Pectinatus*, a produção de sulfureto de hidrogénio causa um odor fecal à cerveja e por isso é das bactérias mais temidas pelos produtores de cerveja.^{13,15}

Outras espécies de bactérias gram-negativas produtoras de ácido acético também podem provocar danos à cerveja, sendo neste caso espécies aeróbicas. As espécies *Gluconobacter* e *Acetobacter* são usualmente referidas como bactérias presentes na cerveja. Estas são capazes de converter etanol em acetato o que confere um sabor

off a vinagre à cerveja. Pelos motivos acima referidos, estas bactérias aeróbias já não representam perigo para a indústria cervejeira.

Tabela 1. Principais espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas encontradas na cerveja e no seu processo de produção.^{12,13,15}

Gram-positivas		Gram-negativas	
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>
			<i>A. liquefaciens</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i>		<i>A. pastorianus</i>
	<i>L. brevisimilis</i>		<i>A. hansenii</i>
	<i>L. buchneri</i>		
	<i>L. casei</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>L. collinoides</i>		
	<i>L. coryneformis</i>	<i>Enterobacter (Rahnella)</i>	<i>E. aerogenes</i>
	<i>L. curvatus</i>		<i>E. agglomerans</i>
	<i>L. delbrueckii</i>		<i>E. cloacae</i>
	<i>L. lindneri</i>		
	<i>L. malefermentans</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>
	<i>L. parabuchneri</i>		
	<i>L. paracasei</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. aerogenes</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. plantarum</i>		<i>K. pneumoniae</i>
			<i>K. terrigena</i>
	<i>Leuc. mesenteroides</i>		
<i>Micrococcus</i>		<i>Megasphaera</i>	<i>M. cerevisiae</i>
	<i>M. kristinae</i>		
	<i>M. varians</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>O. proteus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. clausenii</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>P. cerevisiophilus</i>
	<i>P. damnosus</i>		<i>P. frisingensis</i>
	<i>P. dextrinicus</i>		<i>P. sp. DSM20764</i>

Actividade antimicrobiana dos componentes do lúpulo

Para além de todos os componentes que conferem à cerveja um certo poder bacteriostático e tornam a bebida num ambiente hostil ao desenvolvimento microbiano, os componentes do lúpulo serão aqueles que merecem mais destaque por serem utilizados unicamente na cerveja. O lúpulo é usado no fabrico de cerveja principalmente pelo seu contributo para o sabor mas também por conferir estabilidade à bebida. Podem-se distinguir duas fracções com propriedades anti-sépticas, a fracção dos ácidos- α (humulonas) e dos ácidos- β (lupulonas).^{13,15}

A fracção dos ácidos- α é constituída por uma mistura de compostos homólogos que não são transferidos para a cerveja. Durante a ebulição do mosto, os ácidos- α são convertidos por isomerização em ácidos iso- α , os quais são muito mais solúveis e amargos do que os componentes originais. Foi por volta do ano de 1950 que Rigby e Bethune¹⁶ demonstraram que a fracção dos ácidos- α é constituída por 3 componentes principais; humulonas, cohumulonas e adhumulonas e os componentes amargos da cerveja incluem os 3 principais análogos destes 3 ácidos- α , conhecidos como ácidos iso- α ; isohumulonas, isocohumulonas e isoadhumulonas. Os ácidos- β ou lupulonas são muito pouco solúveis no mosto e na cerveja e não sofrem o mesmo processo de isomerização que os ácidos- α . Consequentemente, eles não são transferidos para a cerveja e por isso não têm valor para o processo de produção da bebida.

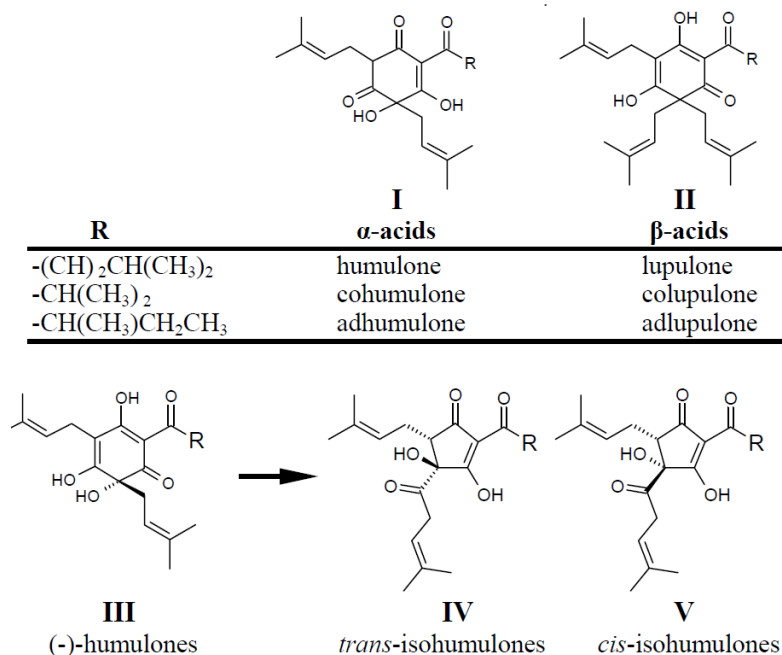


Figura 6 - Estrutura química dos ácidos do lúpulo e das conformações de um dos seus isómeros.¹⁵

A actividade antimicrobiana dos ácidos- α (humulonas) e ácidos- β (lupulonas) tem sido estudada desde há mais de 50 anos. As suas propriedades antissépticas são superiores às dos ácidos iso- α mas dissolvem-se em menor grau na cerveja e na água. Estudos revelaram que os produtos resultantes da ebulição do lúpulo inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas mas não de bactérias Gram-negativas. Mais recentemente foi relatado que as propriedades antibacterianas dos componentes isomerizados do lúpulo aumentam a pH mais baixo, tendo um poder bacteriostático superior na cerveja (pH 5.2) do que no mosto (pH 5.5), onde as humulonas têm um poder antibacteriano superior, tendo se também concluído que as propriedades antissépticas do lúpulo estão relacionadas com a permeabilidade da parede celular das bactérias. Descobriu-se que os componentes do lúpulo e os seus isómeros são capazes de romper a membrana citoplasmática do *Bacillus subtilis*, resultando na inibição do transporte activo de açúcar e aminoácido. Consequentemente há inibição da respiração e de síntese de proteínas, RNA e DNA.¹⁵

Uma vez que os ácidos iso- α são os componentes provenientes do lúpulo presentes em maior concentração na cerveja, foi necessária uma maior compreensão do seu papel na preservação e na estabilidade bacteriológica na cerveja. De um modo geral, estudos realizados com trans-isohumulona em *Lactobacillus brevis* revelaram que este isómero reduz a absorção de leucina pela bactéria e provoca o esvaziamento lentamente da leucina acumulada. Também ficou provado que tem um comportamento ionóforo, retirando catiões divalentes, como por exemplo Mn^{2+} , do interior da célula e por isso provoca uma diminuição do gradiente de pH transmembranar. A actividade protonóforica da trans-isohumulona também requer a presença de iões monovalentes no meio. A capacidade deste componente do lúpulo de se ligar a um ou mais catiões pode ser crucial para a sua acção antibacteriana mas a razão ainda não é bem clara. As propriedades de outros isómeros são semelhantes à da trans-isohumulona sendo provável que o mecanismo da sua actividade antimicrobiana seja igualmente semelhante. Algumas cepas de bactérias produtoras de ácido láctico, que são sensíveis à trans-isohumulona, também são sensíveis à (-)-humulona e à colupulona da mesma forma que outras cepas resistentes à trans-isolupulona também são resistentes aos compostos com ela relacionados.¹⁵

Resistência das bactérias Gram-positivas ao lúpulo

As bactérias gram-positivas capazes de deteriorarem a cerveja, têm de ser resistentes aos componentes do lúpulo para conseguirem se desenvolver na cerveja. De todas as bactérias produtoras de ácido láctico e capazes de adulterarem a

cerveja, as bactérias da espécie *L. brevis* são de longe as mais resistentes. A resistência ao lúpulo por parte deste tipo de bactérias pode ter sido adquirida por imunidade devido ao contacto prolongado com os componentes do lúpulo sob as condições do fabrico de cerveja. Estas bactérias possuem um plasmídeo que contém um gene *horA* que codifica um polipéptido que é 53% idêntico ao *LmrA*, que funciona como transportador de drogas. A proteína heteróloga foi expressa em *Lactococcus lactis* e descobriu-se que funciona igualmente como excretora de drogas e excreta os componentes do lúpulo.^{12,15} O mecanismo de resistência aos componentes do lúpulo encontra-se esquematizado na figura.

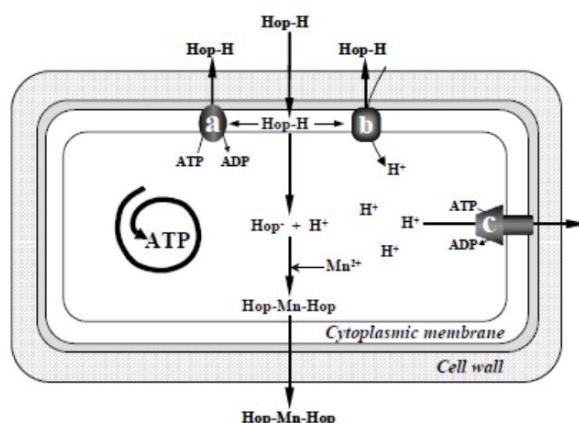


Figura 7- Mecanismo de resistência ao lúpulo. A resistência aos componentes do lúpulo pode ser conferida por vários processos, nomeadamente: Componentes do lúpulo (Hop-H) são expelidos através da membrana citoplasmática pelo HorA (a) e provavelmente também por um transportador dependente da força motriz de prótons (b). Quando os componentes do lúpulo entram para o citoplasma, eles dissociam-se na sua forma aniónica e em prótons. A sob expressão de H^+ -ATPase (c) resulta numa maior actividade da bomba de prótons e na formação de força motriz de prótons. Os componentes do lúpulo conseguem captar aniões divalente como o Mn^{2+} e difundem-se para fora da célula. As espécies resistentes são capazes de gerar mais ATP do que as estirpes sensíveis.¹⁴

Leveduras

Qualquer levedura diferente da levedura fermentativa utilizada é considerada uma levedura selvagem. Geralmente as leveduras selvagens são difíceis de detectar e, ao contrário das bactérias, não são tão susceptíveis aos diferentes *CIPs*, sendo, portanto, impossível erradicá-las do inóculo de leveduras utilizando um tratamento ácido. De facto, a única forma prática de assegurar um inóculo de leveduras livre das leveduras selvagens é a introdução regular de cultivos puros da levedura fermentativa no processo.

Tradicionalmente, as leveduras selvagens são divididas em *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, sendo as *Saccharomyces* spp. consideradas as mais perigosas. Embora a maioria das *Saccharomyces* selvagens detetadas compreenda as *S. cerevisiae*, outras espécies de *Saccharomyces* também têm sido relatadas, dentre as quais se destacam: *S. diastaticus*, *S. pastorianus*, *S. ellipsoideus* e *S. willianus*. A contaminação com esse tipo de levedura pode causar odores fenólicos à cerveja devido à capacidade destes microrganismos de descarboxilar ácidos fenólicos, tais como os ácidos ferúlico e trans-cinâmico. Outro efeito da contaminação de cervejas com estas leveduras é a super-atenuação do produto final, devido à produção e secreção de glucoamilases, permitindo que as leveduras selvagens utilizem as dextrinas, que normalmente não são fermentadas pelas leveduras de cultivo. Algumas cepas de *S. cerevisiae* têm desenvolvido ainda a capacidade de secreção de proteínas (zimocidas), as quais num determinado intervalo de valores de pH são letais para as leveduras de cultivo. A manutenção do pH baixo, indefinidamente, durante uma fermentação contínua, por exemplo, propicia o desenvolvimento da levedura assassina (“killer”), que pode eliminar completamente a levedura de cultivo e produzir sabor desagradável, descrito como erva-fenólico.^{12,13}

As leveduras selvagens não-*Saccharomyces* incluem diversos géneros, tais como *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Endomyces*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis* e *Zygosaccharomyces*. Algumas destas leveduras apresentam formas diferentes quando comparadas com as leveduras fermentativas, podendo ser alongadas ou em forma de limão. Diversos tipos de deterioração da cerveja podem ser causados pelas leveduras selvagens não-*Saccharomyces*. As leveduras dos géneros *Debaryomyces* e *Pichia* e algumas espécies de *Candida*, por exemplo, são responsáveis pelo aumento da turvação, produção de odores anormais descritos como de ésteres (banana e abacaxi) e formação de uma película na superfície da cerveja. Já as leveduras selvagens dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, encontradas na elaboração de cervejas especiais (ale, lambic, porter e Berliner Weiss) e que contribuem com o sabor característico desses produtos, também são consideradas microrganismos deteriorantes de cerveja. Essas leveduras, além de competir com a levedura fermentativa durante a fermentação, conseguem se multiplicar muito bem na cerveja filtrada, proporcionando um desagradável sabor de ácido acético.¹²

Tipos de Cerveja

Várias subespécies de leveduras podem ser distinguidas para além da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, levedura predominante no fabrico de cerveja. Na indústria cervejeira estas são divididas em dois grandes grupos - Leveduras de fermentação alta e de fermentação baixa. As diferenças baseiam-se no seu comportamento durante a fermentação, isto é, enquanto as leveduras de fermentação alta ascendem até a superfície durante a fermentação, as de fermentação baixa depositam no fim da fermentação. Para além disso, as fermentações decorrem a diferentes temperaturas: as de fermentação baixa fermentam entre 8 e 12°C e as de fermentação alta entre 18 e 25 °C.

Lager era o termo usado para descrever cervejas de fermentação em baixo, quer alemãs, quer checas, apesar destas últimas serem mais conhecidas por Pilsener. A palavra deriva do alemão “lagern” que significa armazenar. Este termo referia-se ao hábito de armazenar este tipo de cervejas em locais onde a temperatura era muito baixa durante longos períodos de tempo, antes de se passar à fase de consumo propriamente dita. A principal diferença desse fermento para o que se utilizava no resto da Europa residia no facto de o seu depósito ficar no fundo após a fermentação, ao contrário das Ale, cujo resíduo subia ao topo.¹³

As Pilsener são o estilo de cerveja mais popular e consumido no mundo, A sua cor é, habitualmente, amarela clara e muito brilhante, boa libertação de gás e uma percentagem de álcool que varia entre os 4% e os 5%. Apresentam uma espuma abundante e estável e um aroma fresco, apresentando carácter a lúpulo, com notas florais ou herbáceas, sabor amargo e com um fim de boca seco. Estas cervejas são feitas para agradar a um número máximo de consumidores e por isso tentam não ter sabores muito intensos.^{13,17} As cervejas Pilsener actuais são bastante mais neutras.

Cerveja não pasteurizada e tendências de mercado

Devido à necessidade de suplementar um mercado literalmente sedento por cerveja, foi essencial que houvesse industrialização do processo cervejeiro das marcas mais consumidas. A estabilização do produto apenas é atingida após a filtração e pasteurização, tornando a cerveja homogénea e com mínimas variações de lote para lote, de modo a agradar às massas e a fidelizar o maior número possível de consumidores. A enorme rede de distribuição nacional e internacional também exige que a cerveja esteja estável e que permaneça inalterada por longos períodos, mesmo

quando sujeita a variações térmicas ou a períodos de exposição solar, levando a sua frescura até ao consumidor final.

Mas isto não é uma realidade aplicável a todas as marcas e tipos de cerveja. Cervejarias artesanais em pequena escala comercializam cerveja não pasteurizada e até mesmo sem ser filtrada. O facto de não ser sujeita a um tratamento térmico antes de ser consumida, não implica necessariamente que o seu prazo de validade seja reduzido drasticamente, podendo mesmo ser consumida após longos períodos. Quimicamente a cerveja pode ser considerada como uma solução de água e etanol com pH à volta de 4,5 e com centenas de diferentes moléculas dissolvidas. As condições geradas por estes constituintes conferem à cerveja um certo poder antimicrobiano, evitando por isso o desenvolvimento de fungos e bactérias nesse meio. Se a cerveja não sofrer variações térmicas, sendo mantida a baixas temperaturas durante o seu armazenamento, é muito pouco provável que se deteriore pela acção dos microrganismos presentes.⁸

Para além disso, a pasteurização provoca a desnaturação de proteínas, promovendo a formação de complexos proteína-polifenóis que conseqüentemente irá turvar a cerveja. O calor também promove reações de Maillard, resultando no aumento da cor e a formação de sabores e aromas indesejáveis. Estes são relacionados com oxidação e perda de frescura devido ao desenvolvimento de sabores a papel e cartão, que normalmente só são sentidos após longos períodos de armazenamento pela formação de aldeídos de cadeia longa.⁸

Os gastos energéticos associados a este processo também são um problema associado a este tipo de pasteurização. O pasteurizador em túnel é o equipamento que necessita de um maior investimento e que requer mais energia, à volta de 1,2 milhões de kJ/1000 garrafas. O vapor utilizado para o aquecimento da água que será pulverizada durante a pasteurização é gerado em caldeiras que utilizam *fuel* como combustível.¹³ O vapor gerado tem um custo de 46 €/ton, com tendência a aumentar devido ao facto de ser obtido pela combustão de um combustível fóssil.

Métodos de estabilização alternativos têm, por isso, sido uma opção cada vez mais utilizada, sendo a pasteurização por alta-pressão (HPP) um dos métodos que tem obtido especial atenção por parte das indústrias.

A pasteurização por alta-pressão de produtos alimentares já é aceite em diversos países e é possível encontrar produtos tratados por HPP como carnes, marisco e sumos de fruta. Porém, cerveja tratada por alta-pressão ainda não é comercializada, havendo apenas registo de venda de *Sake* no Japão, caso único de todo o conjunto de

bebidas alcoólicas que necessitam de algum método de estabilização de modo a homogeneizar o produto de forma a aumentar o seu prazo de validade. Estudos realizados à escala laboratorial provam que a tecnologia de HPP, para além de ser capaz de inactivar microrganismos, também pode aprimorar as propriedades organolépticas da cerveja sem efeitos prejudiciais sobre as características de qualidade mais importantes, tais como cor, pH e turvação.¹⁸ Apesar de à partida já ser uma tecnologia com um futuro promissor, mais estudos devem ser realizados, principalmente estudos de análise às propriedades sensoriais, estabilidade da espuma e de aceitabilidade do consumidor a cerveja tratada por HPP como método alternativo aos utilizados actualmente na indústria.

Controlo de Qualidade da Cerveja

No âmbito do estudo da estabilidade de cerveja não pasteurizada e para estudo da redução de UP na cerveja preta, foi essencial um acompanhamento periódico das amostras realizado no laboratório de controlo de qualidade da Unicer. A validação do estudo foi baseada em resultados obtidos por testes físico-químicos, microbiológicos e análise sensorial realizados de acordo com as normas e critérios dos manuais de boas práticas definidas pela *European Brewery Convention*.

Físico-Química

No laboratório de físico-química, realizam-se a maioria dos testes de qualidade à cerveja, sendo analisado nestas área as medições ao teor em álcool, extracto, densidade, pH, cor e atenuação da cerveja; à estabilidade da espuma, concentração de CO₂ e turvação.



Figura 8 - Laboratório das físico-químicas do controlo de qualidade da Unicer.

Auto Analisador Anton-Paar

A análise ao teor em álcool, extracto, densidade, pH, cor e atenuação da amostra de cerveja após filtração em papel é feita em simultâneo por um aparelho Auto analisador Anton Paar.



Figura 9 - Auto Analisador
(alcoholímetro/densitómetro)
Anton Paar.

Este equipamento efectua análises directas ao teor em álcool através de um espectrofotómetro NIR, densidade relativa medida com um densitómetro digital baseado na pressão hidrostática do fluido, cor através de um espectrofotómetro com comprimento de onda de 430 nm e pH.

As medições dos extractos e atenuação são indirectas, obtendo-se os resultados a partir de cálculos utilizando os valores do teor alcoólico e densidade relativa da amostra.

Cor

A cor da cerveja é medida através da absorvância registada após a passagem de um feixe de 430 nm pela amostra. Utilizando a lei de Lambert-Beer com um coeficiente de absorção de 25,0 converte-se a absorvância em cor, medida em EBC.

Teor de álcool

O álcool presente na cerveja provém da fermentação alcoólica do mosto e representa cerca de 5% do volume, variando entre os diferentes tipos de cerveja.¹

A medição do teor alcoólico por espectrometria NIR consiste em fazer passar uma radiação NIR (800 a 2500 nm) através da amostra, fazendo-se a medição da absorvância no detetor.¹⁹ O conteúdo em álcool de uma amostra de cerveja degaseificada é calculado automaticamente a partir do valor de absorvância obtido usando-se o método da recta padrão.

O valor obtido, expresso em % (V/V), é convertido para teor de álcool em %(m/m) através da seguinte fórmula:

$$\text{Álcool \%}(m/m) = \frac{\text{Álcool \% (V/V)} \times 0,791}{SG},$$

Onde,

0,791 é a densidade relativa do etanol a 20/20 ° C

SG - densidade relativa da cerveja degaseificada a 20/20 °C

Densidade Relativa

A densidade relativa da cerveja é medida através da técnica do tubo em U oscilante. O princípio da técnica baseia-se na medição da frequência de oscilação a partir da qual a densidade é obtida, baseada no modelo massa-mola.¹⁹

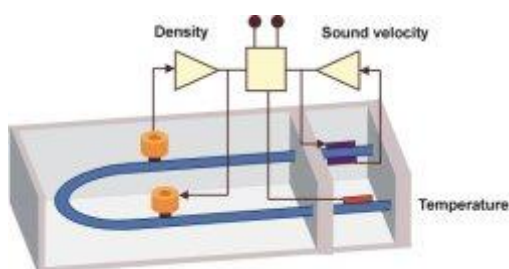


Figura 10 - Representação do Tubo em U oscilante

A amostra é inserida num recipiente em forma de U com capacidade oscilatória cuja frequência de oscilação do conjunto é transformada numa voltagem alternada com a mesma frequência.¹⁹ O período τ é medido e tem relação directa com a densidade da amostra.

$$\rho = A \times \tau^2 - B$$

Onde:

ρ = Densidade da amostra (g/cm³)

τ = Período (s)

A e B = Constantes do aparelho

O resultado é convertido em SG 20/20, ou seja, densidade relativa da amostra a 20 °C em relação à da água ultra-pura também a 20 °C.

Extracto

Com a fermentação, a levedura converte açúcares em dióxido de carbono, etanol, mais levedura e outros compostos que dão o sabor característico à cerveja. A diminuição do teor de açúcar e a presença de etanol (que é sensivelmente menos denso que a água), contribuem para uma diminuição da densidade relativa do mosto transformado agora em cerveja.¹

Na indústria cervejeira, o teor em açúcar de uma cerveja ou do mosto é normalmente expresso em ° Plato. Através de uma fórmula baseada na tabela de Goldiner, Klemann e Kampf, ou tabela de Plato é efectuado o cálculo do extracto aparente e do extracto real da cerveja a partir da densidade relativa da cerveja. O extracto primitivo é calculado com base no teor alcoólico e no extracto real, dando uma aproximação de qual era o teor em açúcares antes da fermentação.^{1,19}

Extracto Aparente

O extracto aparente corresponde apenas a uma medida de teor em açúcar aparente visto ser calculado directamente a partir da densidade da cerveja com álcool. Para converter a densidade da cerveja filtrada em extracto aparente correspondente, o aparelho utiliza a tabela de Goldiner, Klemann e Kämpf ou tabela de Plato. Uma aproximação possível é o seguinte polinómio:

$$EA = - 460,234 + 662,649 \text{ dc} - 202,414 \text{ dc}^2$$

Onde:

EA = Extracto aparente, em % (m/m)

dc = Densidade da cerveja a 20/20 °C

Extracto Real

A quantidade de extracto que não foi convertido em biomassa de levedura, dióxido de carbono ou etanol, ou seja, o extracto real, é estimado através da densidade da cerveja que foi desgaseificada e clarificada por filtração. O cálculo é feito a partir da fórmula de Taberié ($de = dc - da + 1,000$) que nos indica a densidade do resíduo (de) a partir da densidade da cerveja (dc) e da água (da). O extracto real indica o verdadeiro teor em açúcar da cerveja. Automaticamente, o processador transforma a densidade do extracto em teor de extracto real correspondente, usando a Tabela de Goldiner, Klemann e Kampf ou Tabela de Plato. Uma aproximação possível é o seguinte polinómio:

$$ER = - 460,234 + 662,649 \text{ dr} - 202,414 \text{ dr}^2$$

Onde:

ER = Extracto real, em % (m/m)

dr = Densidade do extracto a 20/20 °C

Extracto primitivo

O extracto primitivo corresponde ao teor em açúcares do mosto, ou seja, antes da fermentação ter convertido os açúcares em etanol. O extracto primitivo é calculado a partir de uma fórmula que correlaciona o teor em álcool da cerveja e o seu teor em açúcar, dando uma aproximação precisa de qual seria o teor em açúcar do mosto, antes de se ter iniciado a fermentação.

O auto-analisador calcula o extracto primitivo da cerveja pela fórmula:

$$P = \frac{2,0665 \times A + ER}{100 + 1,0665 \times A} \times 100$$

Onde:

P = Extracto primitivo da cerveja, em ° Plato

A = Teor de álcool da cerveja, em % (m/m)

ER = Extracto real da cerveja, em % Plato

Atenuação

Atenuação é a medida do grau de conversão do açúcar do mosto que foi fermentado e convertido em álcool na cerveja.^{1,17}

Atenuação real (RDF)

A atenuação real ou grau de fermentação real é calculada a partir do valor do extracto real e do teor alcoólico através da seguinte fórmula:

$$RDF (\%) = \frac{2.0665 \times A}{2.0665 \times A + ER} \times 100$$

Onde:

RDF = Atenuação real, em %

A = Teor de álcool da cerveja, em % (m/m)

ER = Extracto real da cerveja, em ° Plato

Atenuação Aparente (ADF)

A atenuação aparente ou grau de fermentação aparente é calculada a partir do valor do extracto aparente e do extracto primitivo através da seguinte fórmula:

$$ADF (\%) = \frac{100(P - EA)}{P \left[1 - \frac{(1.0665 \times EA)}{100 \times 2.0665} \right]}$$

Onde:

ADF = Atenuação Aparente, em %

P = Extracto primitivo da cerveja, em ° Plato

EA = Extracto aparente da cerveja, em ° Plato

Estabilidade da Espuma

A importância da espuma difere bastante de cerveja para cerveja e de país para país. No sul da Inglaterra e na América a cerveja contém relativamente pouca espuma e por isso é cheia até ao rebordo do copo enquanto na maioria dos países europeus o copo é cheio até certo ponto, deixando espaço para a espuma que, dependendo do tipo de cerveja, é mais ou menos importante. Não obstante, a espuma é uma característica essencial de uma boa cerveja. De acordo com a nossa cultura cervejeira, é esperada uma espuma bastante estável numa cerveja de qualidade. A sua formação acontece quando a cerveja é servida como resultado da formação de bolhas de CO₂ libertadas pela redução da pressão. Quanto maior for a concentração de CO₂ dissolvido, mais espuma se forma.^{1,5}

A espuma é uma mistura instável de líquido e gás e o seu abatimento deve-se essencialmente aos seguintes factores:

- À união de pequenas bolhas que formando bolhas maiores rompem o filme de espuma;
- À diferente pressão do gás nas bolhas permitindo a sua difusão;
- Ao fluxo descendente do líquido formado na espuma;
- Ao desequilíbrio entre a composição gasosa na espuma e a composição do ar circundante e devido à temperatura ambiente.

Apesar do CO₂ ser o responsável pela formação da espuma, a sua estabilidade depende de outros compostos, na sua grande maioria proteínas de elevado peso molecular provenientes do malte e dos ácidos do lúpulo. Outros adjuvantes influenciam a estabilidade da espuma, tais como catiões metálicos que, através de ligações iónicas, reforçam as interações entre os ácidos iso- α ou polifenóis e polissacarídeos, como por exemplo β -glucanas e arabinoxilanas. Por sua vez, outros componentes tais como lípidos e aminoácidos e elevados níveis de etanol têm um efeito desestabilizador sobre a espuma.^{1,4,5}

A medição da estabilidade da espuma é feita com a amostra a uma temperatura de 20,0 +/- 0,5 °C através de um aparelho Haffsman NIBEM-T que utiliza um sistema de eléctrodos que, acompanhando a superfície da espuma, medem o tempo de abatimento de 10 mm, 20 mm e 30 mm de espuma. Um sensor incorporado no eléctrodo central faz a leitura da temperatura. Quando a altura da espuma sofre um abatimento de 30 mm, o tempo em segundos é contabilizado. Considera-se aprovada uma cerveja cuja medição seja superior a 250 seg.



Figuras 11 e 12 - Representação da injeção de CO_2 na garrafa para formação de espuma e medição do seu abatimento no aparelho Haffsman NIBEM-T.

Teor em CO_2

O CO_2 é um dos mais importantes critérios de qualidade da cerveja. Este é produzido durante a fermentação alcoólica mas apenas 15% se mantém dissolvido na cerveja. O restante é recuperado e utilizado para a carbonatação da cerveja de modo a se atingir uma concentração ideal de CO_2 no produto acabado. A solubilidade do CO_2 depende da temperatura e da pressão por isso a carbonatação é feita em linha a baixas temperaturas e sobre pressão.¹

A medição do CO_2 é feita através de um aparelho Carbo QC da Anton Paar. O princípio da operação é baseado no método dos múltiplos volumes de expansão, devido à diferença do volume de expansão do CO_2 em comparação com o de outros gases.¹⁷



Figura 13 - Medição do teor de CO_2 efectuada com o aparelho Carbo QC da Anton Paar.

As figuras 12 e 13 demonstram como o princípio do método elimina a influência do ar dissolvido ou do azoto no resultado obtido: o conteúdo em CO_2 é medido em duas expansões de volume diferentes na câmara de medição, por exemplo a 10 e 30%. Se os dois resultados forem idênticos, significa que não existe ar ou azoto dissolvido na amostra e por isso não é necessário fazer nenhuma correcção. Se houver ar ou azoto dissolvidos, a segunda medição é inferior à primeira. A diferença entre os 2 resultados é usada para calcular a correcção que elimina a influência do ar e do azoto na medição.¹⁹

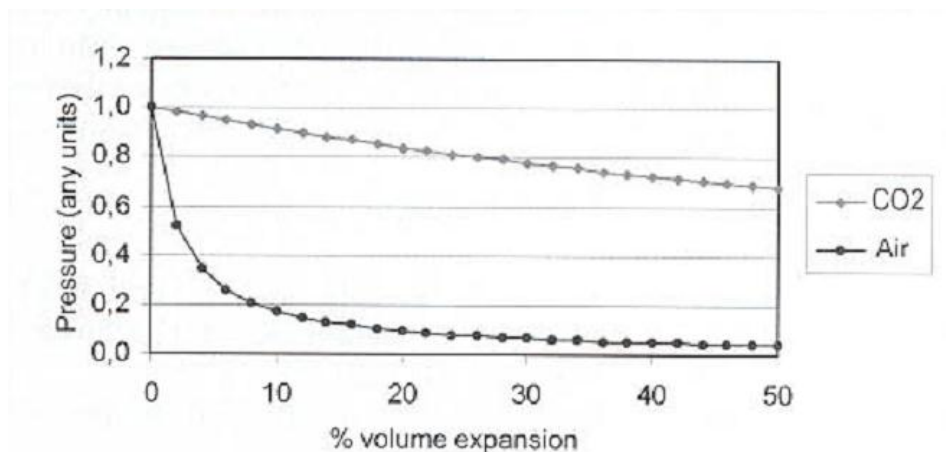


Figura 14 - Representação gráfica da diferença do volume de expansão do CO_2 em relação ao ar atmosférico.

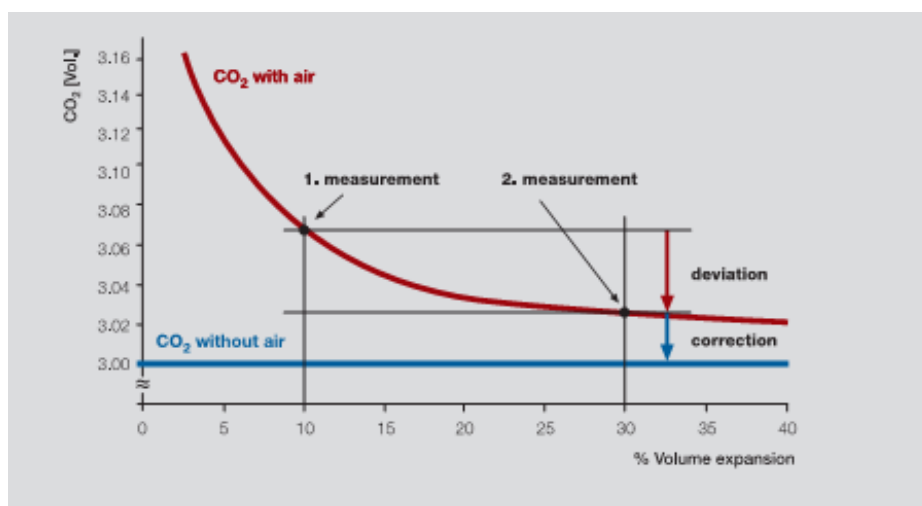


Figura 15 - Princípio da medição do teor de CO_2 segundo a técnica do volume de expansão.

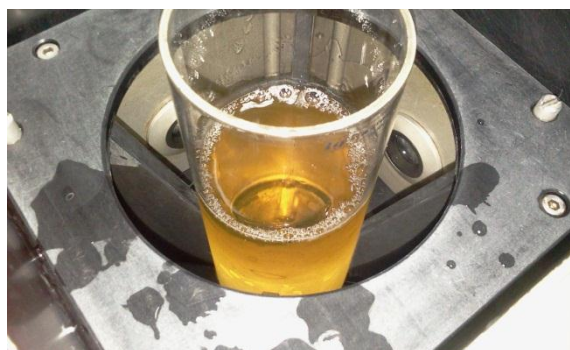
Turvação

A turvação é causada pela presença de materiais em suspensão, isto é, de materiais que não estão dissolvidos no fluido, cuja presença altera as suas propriedades ópticas. A turvação pode assim ser causada por uma enorme variedade de matérias em suspensão, de origem orgânica ou inorgânica, variando em dimensão desde partículas coloidais até sólidos de dimensões macroscópicas.

Na indústria cervejeira a turvação é considerada uma característica importante no controlo de qualidade e na fixação das características finais do produto.

Não sendo uma grandeza física, a turvação não pode ser medida directamente recorrendo a uma única propriedade do fluido ou dos materiais nele suspensos, sendo antes avaliada pela comparação com padrões arbitrariamente estabelecidos por normas técnicas, os quais em geral diferem consoante o sector de actividade e o objectivo da medição. A turvação é em geral medida comparando a difracção de um feixe de luz ao atravessar a amostra com a difracção obtida, com o mesmo feixe e em iguais condições, ao atravessar uma suspensão padrão, sendo em geral expresso em Unidades Nefelométricas de Turvação, ou UNT, por vezes convertidas no seu equivalente em EBC.¹⁷

O turbidímetro é composto por mais do que um sensor sensíveis a partículas inferiores a 1 μm presentes na amostra descarbonatada a 20 °C inserida num copo de quartzo colocado perpendicularmente ao feixe de 560 nm. A medição é efectuada com água ultra-pura como meio.



Figuras 16 e 17 - turbidímetro e representação da medição da turvação de uma amostra.

Amargor

O conteúdo em substâncias amargas provenientes do lúpulo já foi demonstrado ser um parâmetro de especial relevância para a estabilidade da cerveja. Estas substâncias encontram-se essencialmente na espuma da cerveja e por isso a sua quantificação é feita adicionando uma gota de octanol, que funciona como anti-espumante, à cerveja a descarbonatar. De seguida são pipetados 10 ml de amostra para um matraz onde são adicionados 0,5 ml de solução de ácido clorídrico ≈ 6 M. seguidamente adiciona-se 20 ml de iso-octano e leva-se a solução a agitar durante 15 min. Após repousar da agitação e ser distinguível a separação das duas fases, é feita a leitura da absorvância no espectrofotómetro da fase superior numa cuvete de 10 mm a um comprimento de onda de 275 nm. O iso-octano é utilizado como referência.

O resultado da medição é multiplicado pelo factor 50, obtendo-se o amargor da amostra em Unidades de Amargor, definidas pelo manual de boas prática da *European Brewery Convention*.

Microbiologia

Filtração por membrana

Esta técnica é utilizada para amostras líquidas que contêm um número reduzido de microrganismos ou seja menos de uma unidade formadora de colónia por mililitro.

A cerveja é filtrada, sob condições assépticas, através de uma membrana de superfície negra quadriculada de cerca de 47 mm de diâmetro com um poro de 0,45 μm . A amostra é colocada num copo descartável de 100 ml e filtrada por vácuo através da membrana. O procedimento é repetido de modo a que a cerveja proveniente da mesma garrafa seja filtrada através de 2 membranas. As membranas são então transferidas para a superfície do meio de cultura UBA (Universal Beer Agar) com auxílio de uma pinça. As caixas de petri que contêm o meio de cultura e a membrana são incubadas a 27 °C, uma em aerobiose para contagem de colónias de microrganismos não nocivos à cerveja, outra é colocada numa câmara de anaerobiose gerada por AnaeroGen para quantificação de colónias de microrganismos nocivos à cerveja.¹⁷

A contagem de colónias é feita ao fim de 3 dias em incubação para os organismos não nocivos e ao fim de 7 dias para os nocivos.

O resultado é expresso em número de colónias por 100 ml.

Todas as amostras são analisadas em triplicado (3 garrafas do mesmo lote) para validação do resultado obtido.

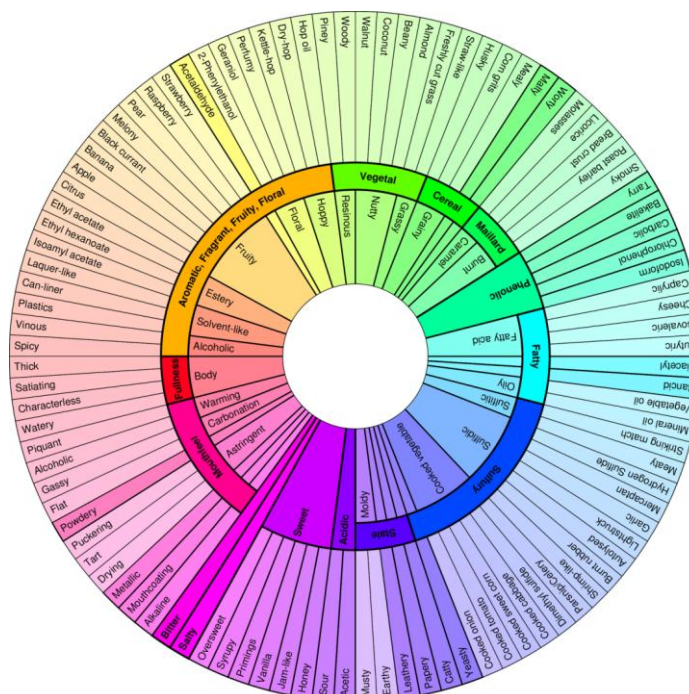
Figura 18 - Câmara de fluxo laminar onde são realizadas as incubações através da rampa filtrante por diferença de pressão gerada pela bomba de vácuo.



Análise sensorial

A análise sensorial da cerveja é realizada na sala de provas por um painel de provadores credenciados, que realizam uma apreciação às amostras baseando-se numa tabela com os diversos aromas que poderão ser sentidos. (Ver tabela em anexo da terminologia recomendada pela EBC para descrever sensações de aroma/gosto.) A famosa *Beer Wheel Flavor* desenvolvida pelo Químico Morton Meilgaard é uma representação bastante completa dos diferentes aromas e sabores que podem ser distinguidos durante a prova da cerveja.

Figura 19 - Roda dos sabores de cerveja de Meilgaard.



O resultado da apreciação é registado por cada provador, sem que estes saibam inicialmente que amostras se encontram em prova, apenas o tipo de cerveja.

Controlo Organoléptico

Entende-se por Controlo organoléptico a avaliação do aroma e gosto (“flavour”) de um produto, visando estabelecer se o produto apresenta qualidade satisfatória. A avaliação é realizada, em circunstâncias controladas, por uma equipa treinada de, no mínimo, 5 pessoas.

O produto fresco deverá ser provado o mais rapidamente possível e após 24 horas de estabilização no frio. As amostras devem ser servidas, preferencialmente, a 12 °C para que a percepção do aroma e gosto (“flavour”) seja completa.

A quantidade a colocar em cada copo é de 30 a 50 ml.

A escala a utilizar para expressar as diferentes impressões sentidas no aroma e gosto é a seguinte:

+1 = Produto de óptima qualidade

0 = Normal para este tipo de produto

-1 = Com defeitos aceitáveis para este tipo de produto

-2 = Com defeitos não aceitáveis para este tipo de produto

-3 = Com defeitos tão graves que requerem acção imediata

Após atribuição por escrito da avaliação por todos os provadores, exhibe-se o código das amostras e pede-se, a cada provador, a respectiva avaliação. Faz-se, simultaneamente, a combinação das respostas no quadro. Desta forma, os provadores terão conhecimento da qualidade de cada amostra e dos comentários que foram feitos pelos outros provadores.

O boletim a preencher pelos provadores encontra-se em anexo no qual devem ser descritas as impressões de aroma e gosto detectadas, especialmente se for atribuída uma pontuação igual ou inferior a -1. Após a prova, é realizado o registo dos resultados informaticamente e o resultado é comparado graficamente com o resultado da sessão anterior, da mesma cerveja de modo a fazer-se o acompanhamento ao envelhecimento das amostras em estudo. No âmbito do estágio, o controlo organoléptico das amostras de cerveja estudadas foi realizado semanalmente, e comparado o resultado com os obtidos previamente, de modo a seja possível fazer o acompanhamento da estabilidade da cerveja ao longo do tempo.

Teste Triangular

Entende-se por Teste Triangular a avaliação sobre duas amostras em 3 copos (uma delas representada uma só vez e a outra representada duas vezes), envolvendo parte ou todos os atributos sensoriais (cheiro, amargor, etc.). O método é estatisticamente eficiente, embora um pouco limitado devido a condições psicológicas e fadiga sensorial. Deve realizar-se com o maior número possível de provadores, nunca inferior a 7. O ideal seria sempre superior a 10.

Apresenta-se simultaneamente aos provadores de um conjunto de 3 amostras, duas das quais são iguais. A quantidade a colocar em cada copo é de 30 a 50 ml, em igualdade pelos 3 copos devidamente codificados e é registado (tendo em conta as 6 possibilidades de combinações: ABB, BBA, AAB, BBA, ABA e BAB.) O provador regista a sua apreciação num boletim que segue em anexo.

No fim da prova, exhibe-se a codificação das amostras para que os provadores as decodifiquem. Pergunta-se a cada provador qual das amostras é a diferente, qual a preferida e porquê. Faz-se o somatório das respostas certas e a interpretação do resultado exibindo a tabela dos níveis de significância. Desta forma, os provadores tomam conhecimento do resultado do teste.

Durante o estágio, este teste foi realizado com as cervejas pretas, de modo a detectar as diferenças sensoriais significativas que a redução da pasteurização possa ter efeito nas amostras.

Descrição técnica e discussão dos resultados

O principal objecto do estudo desenvolvido foi a cerveja em garrafa não pasteurizada. De forma a se obterem as amostras, foi necessário arquitectar um plano de amostragem eficaz de modo a que o estudo se pudesse desenrolar fluidamente e de modo uniforme, reduzindo ao máximo a interacção de factores externos. A imagem em baixo representada, exhibe o desenho do processo adoptado para o estudo em questão.

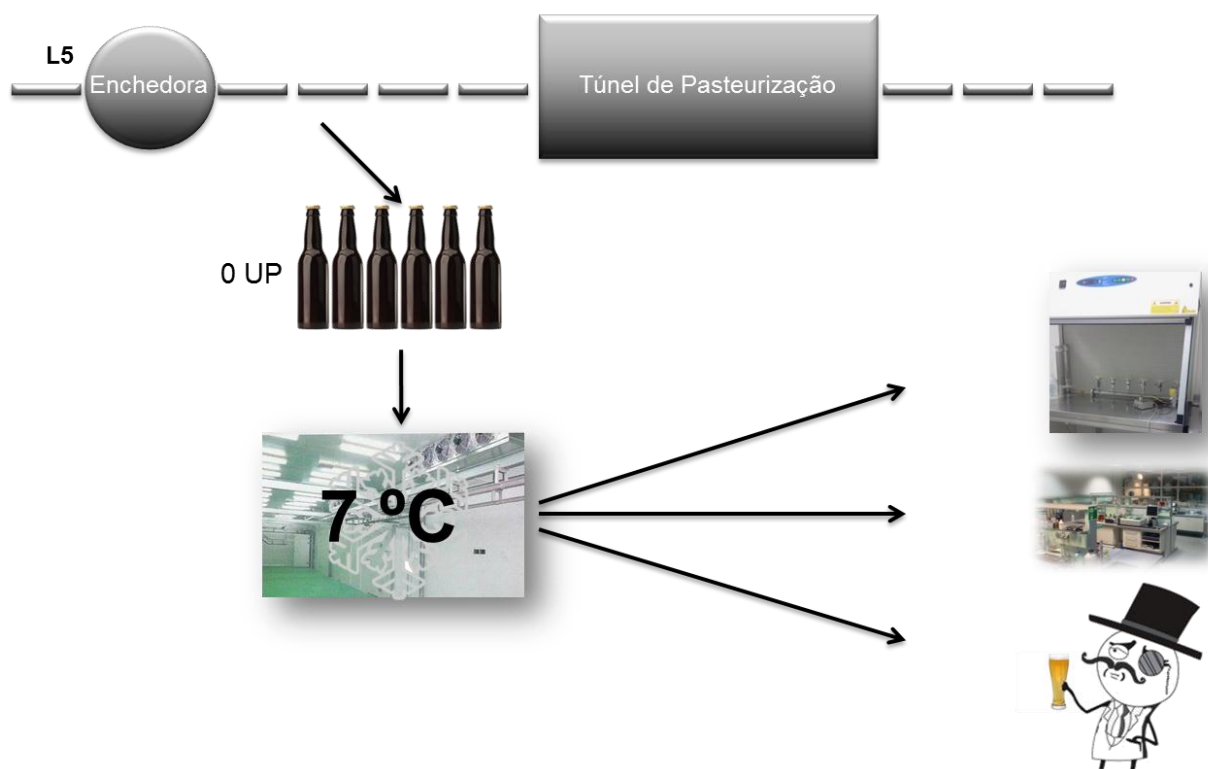


Figura 20 - Desenho do processo adoptado para a realização do estudo.

Por uma questão de standardização do processo, procedeu-se apenas ao estudo de um tipo de cerveja, como já foi referido, e também as amostras foram obtidas da mesma linha de enchimento. Saliento que não existe nenhum estudo realizado até ao momento que comprove diferenças ao nível de contaminação microbiológica desde os TCF's até às enchedoras das diferentes linhas de enchimento.

Ao longo de 8 meses foram recolhidas amostras de 13 enchimentos em garrafa Tara Perdida de 33 cl, à saída da mesma enchedora, antes da passagem pelo pasteurizador. De imediato as garrafas eram conduzidas ao seu local de armazenamento, uma camara fria, onde permanecem a uma temperatura constante de aproximadamente 7°C.

A avaliação dos parâmetros de qualidade de cerveja foi desenrolada, respeitando as normas da EBC, de modo a que pudéssemos cumprir os objectivos iniciais deste trabalho.

A caracterização das amostras foi feita periodicamente ao longo do estudo em termos microbiológicos, físico-químicos e pela avaliação do seu perfil sensorial.

Desenvolvimento Microbiológico

As análises do controlo microbiológico realizadas no laboratório de controlo de qualidade da Unicer podem ser efectuadas por diferentes métodos, tendo-se optado pelo método de contagem de UFC para avaliação do desenvolvimento de microrganismos presentes nas amostras do presente estudo.

Através de uma filtração em rampa e em ambiente asséptico recorrendo a uma câmara de fluxo laminar, 100 ml de cada amostra eram sujeitos à passagem por um microfiltro com poros de 0,45 μm que de seguida era colocado em contacto com meio de cultura UBA numa caixa de petri e incubado na estufa a uma temperatura constante de 36°C. Da mesma amostra, foram efectuadas 2 filtrações, uma colocada em aerobiose durante 3 dias, outra foi fechada numa jarra de anaerobiose, ambiente gerado através da exposição de uma saqueta contendo ácido ascórbico que reage com as moléculas de oxigénio presentes no ar dentro da jarra e rapidamente transforma-o em dióxido de carbono. Neste caso, a contagem de UFC's é efectuada ao fim de 7 dias.

A distinção entre as incubações é feita utilizando os termos de “Não Nocivos”, para as colónias de microrganismos que se desenvolvem na presença de oxigénio e de “Nocivos” relativamente aos microrganismos que se desenvolveram em condições anaeróbias. Esta distinção é baseada e concordância com o ambiente que é encontrado no interior das garrafas de produto, onde a concentração de oxigénio, por norma, terá de ser inferior a 0,01 ppm. Ou seja, apenas aqueles capazes de se desenvolverem na ausência de oxigénio é que poderão ser potencialmente nocivos à cerveja. Os parâmetros de qualidade estabelecidos exigem que as amostras pasteurizadas exibam crescimento de organismos nocivos e não nocivos, igual a zero.

Neste estudo, todas as amostras eram filtradas e incubadas em triplicado e esta análise era realizada periodicamente com o objectivo de avaliar a potencial propagação e desenvolvimento de microrganismos no interior da garrafa.

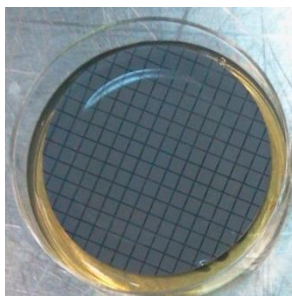
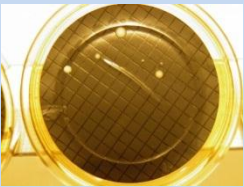
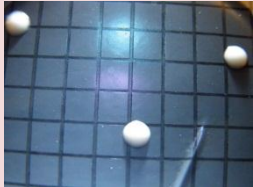
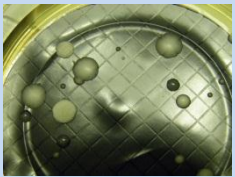
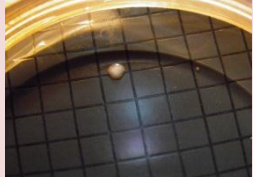
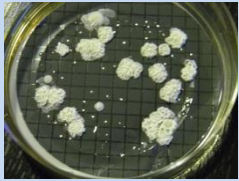

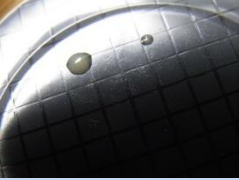
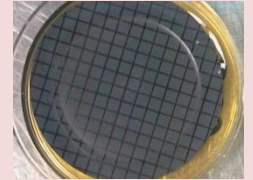
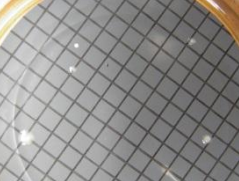
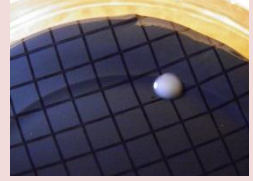

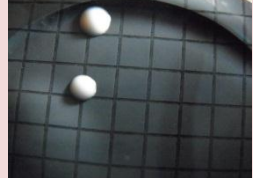
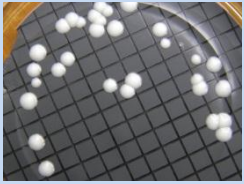
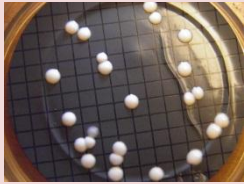
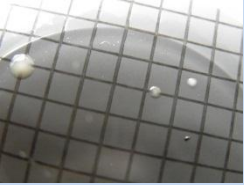

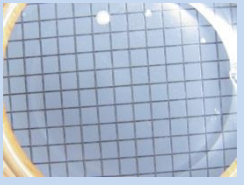
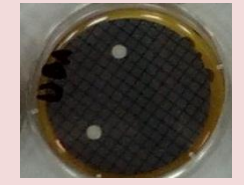
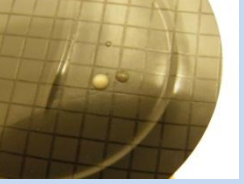
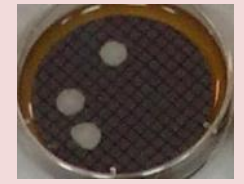
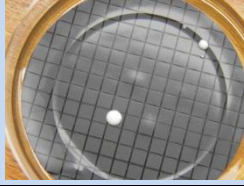

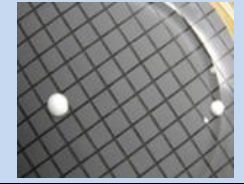


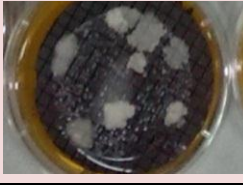


Figura 21: Exemplo de amostra pasteurizada analisada pelo método de filtração em rampa. Resultado: 0 UFC/100 ml.

Tabela 2: número médio de UFC por recolha em ambiente aeróbio e anaeróbio.

	Número médio de UFC/100 ml - não nocivos	Fotografia das amostras - não nocivos	Número médio de UFC/100 ml - nocivos	Fotografias das amostras - nocivos
1ª Amostra 19/Out	12		3	
2ª Amostra 31/Out	14		1	
3ª Amostra 23/Nov	52		4	
4ª Amostra 10/Dez	2		0	
5ª Amostra 3/Jan	5		1	
6ª Amostra 9/Jan	27		7	

Cont.	Número médio de UFC/100 ml - não nocivos	Fotografia das amostras - não nocivos	Número médio de UFC/100 ml - nocivos	Fotografia das amostras - nocivos
7ª Amostra 10/Fev	36		32	
8ª Amostra 15/Mar	9		16	
9ª Amostra 26/Mar	3		4	
10ª Amostra 4/Abr	4		2	
11ª Amostra 7/Mai	1		1	
12ª Amostra 17/Mai	4		1	
13ª Amostra 5/Jun	>300		>300	

O resultado obtido nas incubações das amostras revelou uma diversidade significativa de microrganismos presentes no processo industrial e que estão presentes até à fase que antecede a pasteurização. Para além disso, também há a salientar a diferença na intensidade da contaminação das amostras. Os microrganismos contaminantes são na sua grande maioria leveduras selvagens e bactérias lácticas que podem ter entrado no processo através das matérias-primas, por exemplo, pela água, pelo dióxido de carbono utilizado na carbonatação da cerveja filtrada ou pela garrafa nova proveniente do fabricante mas que está em contacto com o ar.

O resultado obtido mais importante a salientar é o facto de o desenvolvimento dos microrganismos dentro da garrafa ser nulo. A contagem das UFC podem ter algumas diferenças entre os ensaios realizados mas nenhum resultado crescente ou decrescente a registar ao longo das incubações. Apenas a variabilidade característica do método em si.

Desta forma, podemos comprovar que para este tipo de cerveja observamos o mesmo efeito bacteriostático descrito na literatura relativamente a outras cervejas que foram igualmente objecto de estudo. As condições geradas dentro da garrafa constituem um ambiente inóspito ao desenvolvimento dos microrganismos que estão num estado latente, não havendo propagação. O facto de contarmos o mesmo número médio de UFC desde a primeira análise é sinonimo disso mesmo.

Outra observação relevante baseia-se na diversidade de microrganismos presentes nas diferentes amostras. A análise visual efectuada, e representada em cima por fotografias, foi baseada na morfologia no número de colónia. É de salientar a disparidade em termos microbiológicos entre as amostras recolhidas em diferentes alturas, essencialmente ao nível de microrganismos aeróbios. A diversidade morfológica observada vai de encontro ao que está descrito na literatura, ou seja, existe um número elevado de espécies presentes no processo cervejeiro mas são poucas as que poderão representar riscos para a qualidade do produto.

A variedade microbiológica observada entre as diferentes amostras pode ser explicada pela influência de diversos factores externos a que o processo é sujeito. Os CIP são realizados com alguma periodicidade mas, como é óbvio, não em simultâneo em toda a fábrica. Isto explica como microrganismos são capazes de chegar até ao produto na fase que antecede a pasteurização, em concentrações e na diversidade de espécies acima representados.

Análises Físico-químicas

No laboratório central da Unicer são efectuadas análises físico-químicas aos lotes de cerveja que seguem para o mercado até ao consumidor. As características analisadas vão determinar se o produto apresenta qualidade para poder ser comercializado.

Todas as análises realizadas no âmbito do estudo tinham essencialmente o objectivo de determinar a influência da presença dos microrganismos na cerveja, tendo-se acompanhado periodicamente certas características previamente deliberadas como as que poderiam ser mais susceptíveis a alterações devido à remoção do processo de pasteurização. Para isso, tiveram-se em conta os limites inferior e superior de especificação estipulados pela departamento de controlo de qualidade.

Como podemos comprovar pela análise microbiológica à cerveja não pasteurizada, há uma grande diversidade de microrganismos nas amostras que, potencialmente, poderiam acelerar a deterioração da cerveja pela produção de metabolitos que iriam influenciar directa ou indirectamente certas características físico-químicas ou o perfil organoléptico da cerveja.

As análises efectuadas basearam-se na medição e acompanhamento do teor de álcool, teor em açúcares ou extracto, grau de fermentação (RDF), cor, pH, estabilidade da espuma, turvação, concentração de CO₂ e amargor ou teor em ácidos do lúpulo iso- α .

Os resultados de teor em etanol, extracto, RDF, cor e pH são obtidos usando o mesmo aparelho, o auto-analisador Anton-Paar. Os métodos utilizados para as restantes medições encontram descritos mais abaixo.

Concentração de Etanol

O etanol é um produto resultante do metabolismo das leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica que transforma o mosto em cerveja. Para além da levedura cervejeira, outros microrganismos contaminantes também são capazes de obter energia através de fermentação alcoólica ou láctica, sendo o novamente o etanol e o ácido láctico um dos metabolitos resultantes, respectivamente.

Se o ambiente gerado dentro da garrafa fosse propício ao desenvolvimento e propagação dos microrganismos, a concentração de etanol iria aumentar como produto resultante do seu metabolismo.

Desta forma, periodicamente, as amostras foram analisadas e o seu teor em etanol foi quantificado e comparado com o resultado inicial e com os limites de especificação definidos de 4,7 e 5,2 % (v/v), através do alcoolímetro do aparelho Anton Paar.

O estudo das incertezas associadas ao método de ensaio de etanol na cerveja é realizado periodicamente com abordagem Nordtest, obtendo-se a incerteza associada à exactidão e precisão do método. A verificação mais recente data de Junho de 2012, na qual se obtiveram os seguintes resultados.

Tabela 3: Resultado do cálculo das incertezas da medição do teor de álcool.

Data	Amostra	Álcool (%v/v)	Incerteza Expandida (%v/v)	Incerteza Expandida (%)	Incerteza Combinada (%)	Incerteza Veracidade (%)	Incerteza Precisão (%)
15-06-2012	X	4,87	0,03	0,55	0,27	0,26	0,08

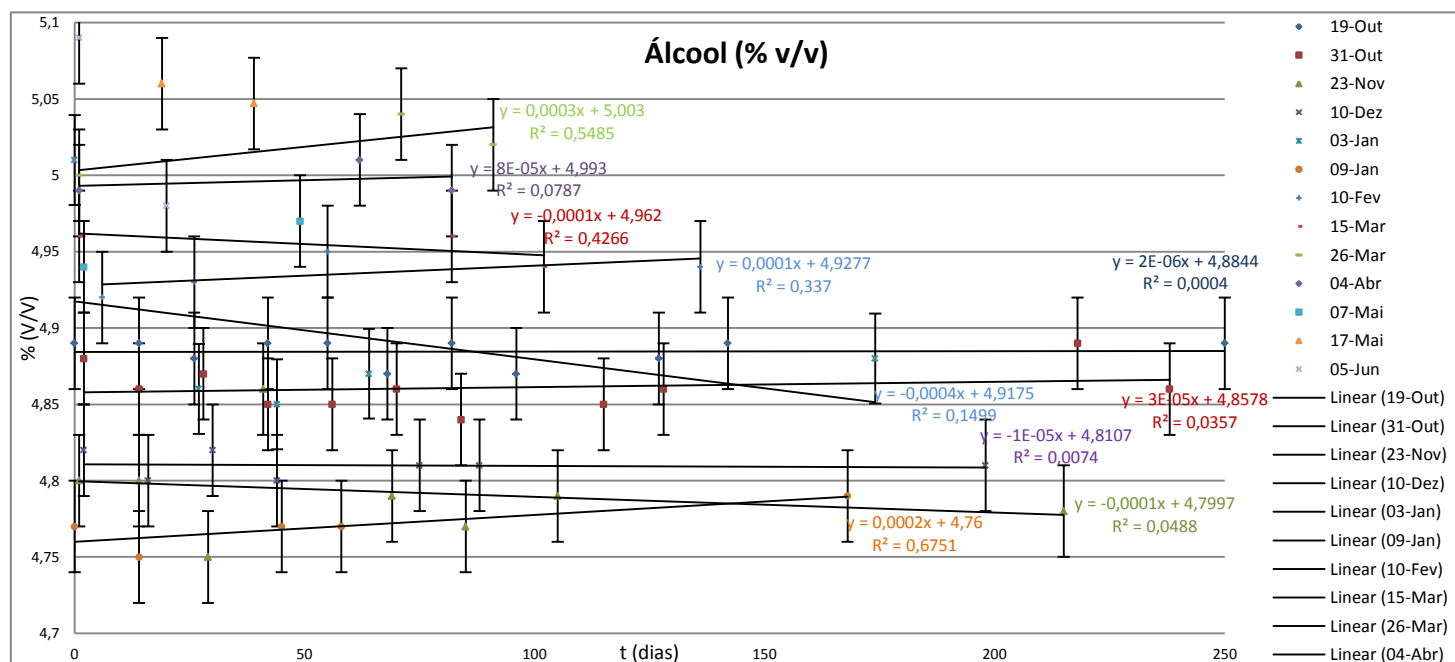


Gráfico 1: Acompanhamento do teor de álcool das amostras estudadas.

Como podemos observar pelo gráfico acima representado, as amostras foram comparadas periodicamente em termos de teor de etanol. O resultado comprova que não há alterações significativas no seu teor nas amostras analisadas.

Como vimos pela análise microbiológica, o desenvolvimento dos microrganismos é retardado pelas condições do meio, sendo imperceptível a sua propagação nas amostras. A conservação do teor de etanol inicial das amostras é uma prova que o metabolismo dos microrganismos encontra-se num estado latente, uma vez que não possuem um meio propício ao seu desenvolvimento.

Extracto Real (Er)

A quantidade de extracto que não foi convertido em biomassa de levedura, dióxido de carbono ou etanol, ou seja, o extracto real, é estimado através da densidade da cerveja que foi desgaseificada e clarificada por filtração. O cálculo é feito a partir da fórmula de Taberié ($de = dc - da + 1,000$) que nos indica a densidade do resíduo (de) a partir da densidade da cerveja (dc) e da água (da). O extracto real indica o verdadeiro teor em açúcar da cerveja. Automaticamente, o processador transforma a densidade do extracto em teor de extracto real correspondente, usando a Tabela de Goldiner, Klemann e Kampf ou Tabela de Plato. Uma aproximação possível é o seguinte polinómio:

$$ER = - 460,234 + 662,649 dr - 202,414 dr^2$$

Onde:

ER = Extracto real, em % (m/m)

dr = Densidade do extracto a 20/20 °C

Sendo o açúcar remanescente o substrato que a levedura ou os restantes microrganismos poderiam converter através do seu metabolismo, o acompanhamento deste parâmetro indica-nos o estado do metabolismo microbiano se encontra, uma vez que iria decrescer caso fermentações secundárias ocorressem.

O estudo das incertezas associadas ao método de ensaio de extracto na cerveja é realizado periodicamente com abordagem Nordtest, obtendo-se a incerteza associada à exactidão e precisão do método. A verificação mais recente data de Abril de 2011, na qual se obtiveram os seguintes resultados.

Tabela 4: Resultado do cálculo das incertezas da medição do extracto.

Data	Amostra	Extracto Primitivo (%Plato)	Incerteza Expandida (%Plato)	Incerteza Expandida (%)	Incerteza Combinada (%)	Incerteza Veracidade (%)	Incerteza Precisão (%)
15-04-2011	X	10,82	0,05	0,482	0,241	0,195	0,141

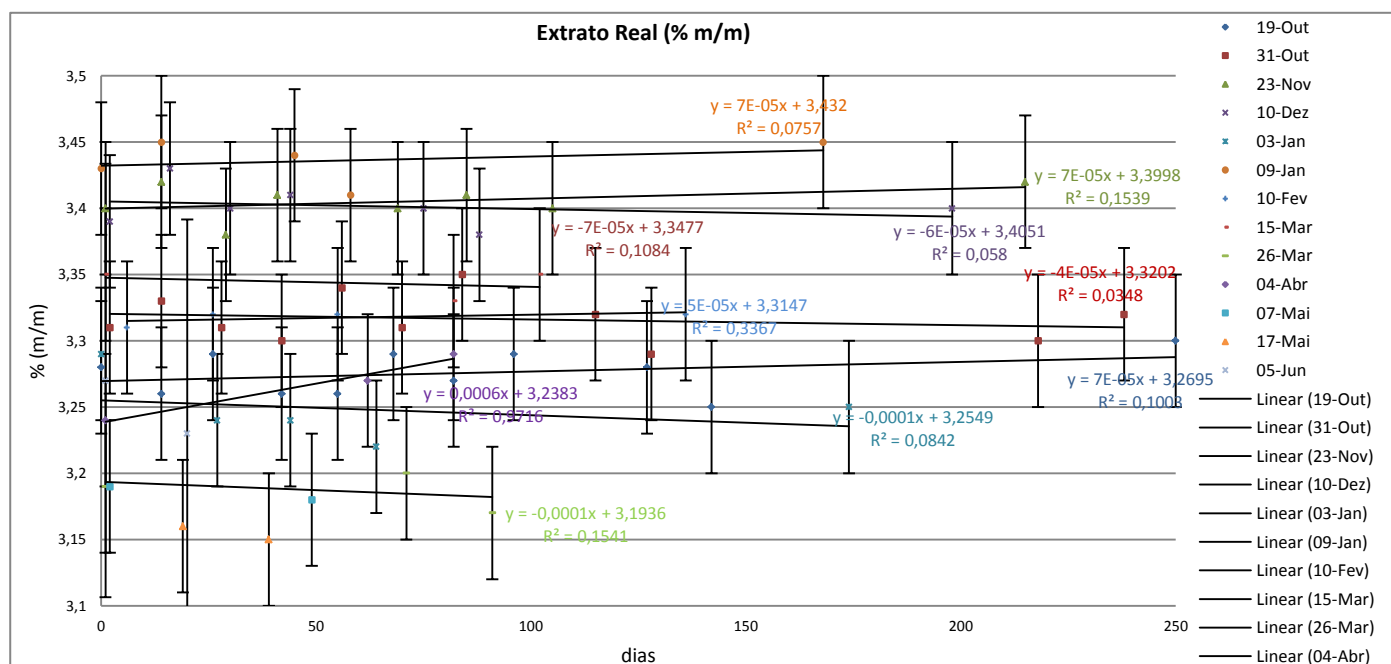


Gráfico 2: Acompanhamento do extracto das amostras de cerveja.

Pela observação dos resultados obtidos, expressos no gráfico acima representado, podemos concluir que o teor de açúcares fermentescíveis permanece inalterado ao longo do estudo, não havendo degradação destes pelo metabolismo dos microrganismos presentes. Desta forma, podemos concluir que os microrganismos presentes não degradaram estes açúcares durante o período do acompanhamento.

Grau de Fermentação (RDF)

O grau de fermentação ou atenuação corresponde à percentagem de açúcares fermentescíveis que foram consumidos pela levedura. Existe uma proporção directa entre o grau de fermentação e o teor alcoólico e uma proporcionalidade inversa com o extracto da cerveja. A seguinte fórmula é calculada automaticamente pelo auto-analisador Anton Paar.

$$RDF (\%) = \frac{2.0665 \times A}{2.0665 \times A + ER} \times 100$$

Onde:

RDF = Atenuação real, em %

A = Teor de álcool da cerveja, em % (m/m)

ER = Extracto real da cerveja, em ° Plato

Caso a cerveja sofresse uma refermentação alcoólica, provocada pelos microrganismos nela presentes, o grau de fermentação iria aumentar, consequência do consumo dos açúcares fermentescíveis e a sua consequente conversão em etanol, por parte dos microrganismos contaminantes.

Os limites de especificação para esta cerveja situam-se entre os 67 e 73%.

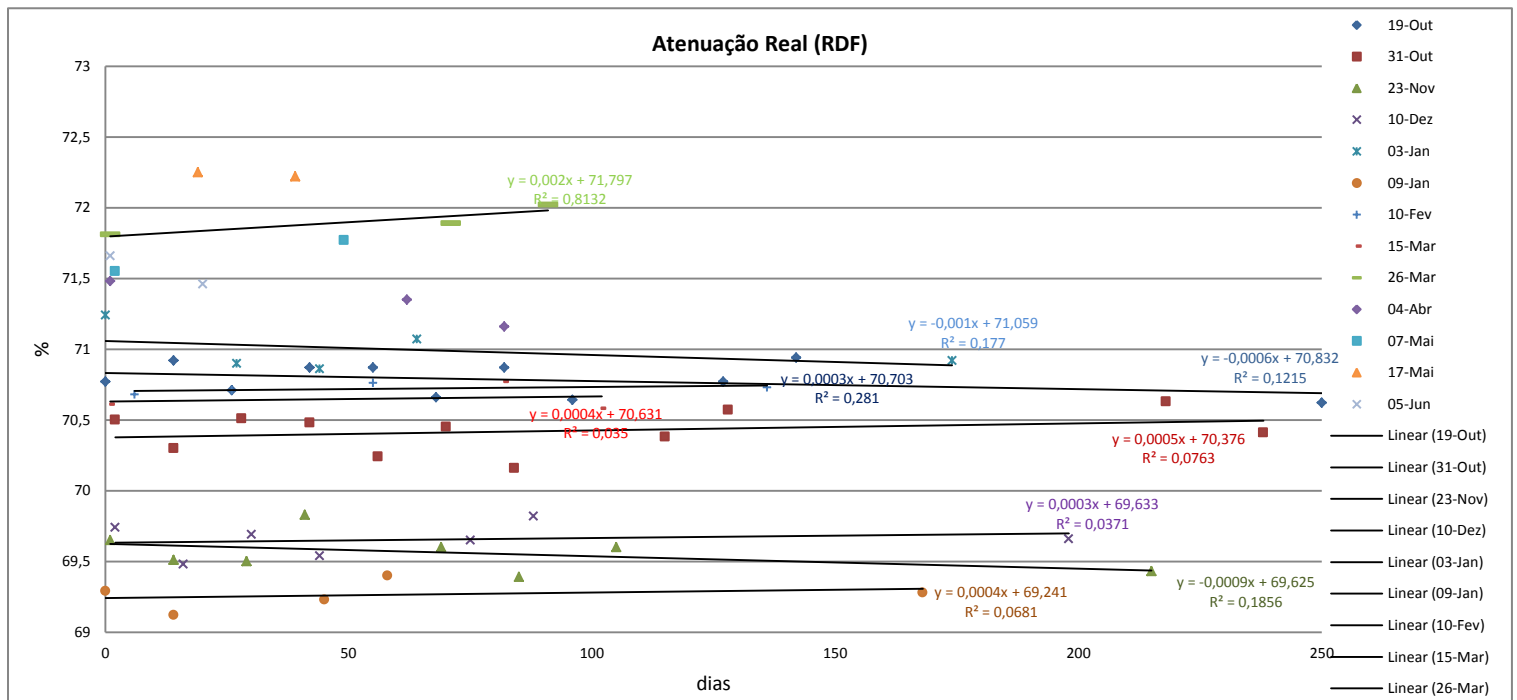


Gráfico 3: Acompanhamento da atenuação real das amostras.

Pode-se concluir pela análise dos dados que o grau de fermentação permanece constante em todas as amostras, o que prova que a cerveja não sofre uma refermentação, não sendo verificada portanto a redução dos açúcares remanescente e consequente formação de etanol, provando novamente a latência do metabolismo dos microrganismos presentes nas amostras.

Cor

A cor da cerveja é um parâmetro de qualidade que pode variar ao longo do tempo, tendendo a escurecer com o envelhecimento. Tal facto acontece devido a certas reacções, nomeadamente reacções de Maillard e degradação de Stecker. Neste estudo em concreto, estes acontecimentos teoricamente teriam um impacto muito menor devido às condições de armazenamento, em que se manteve a temperatura abaixo dos 7º C.

O limite de especificação inferior e superior da cor, neste tipo de cerveja, em unidades EBC, situa-se entre os 6 e 8 EBC.

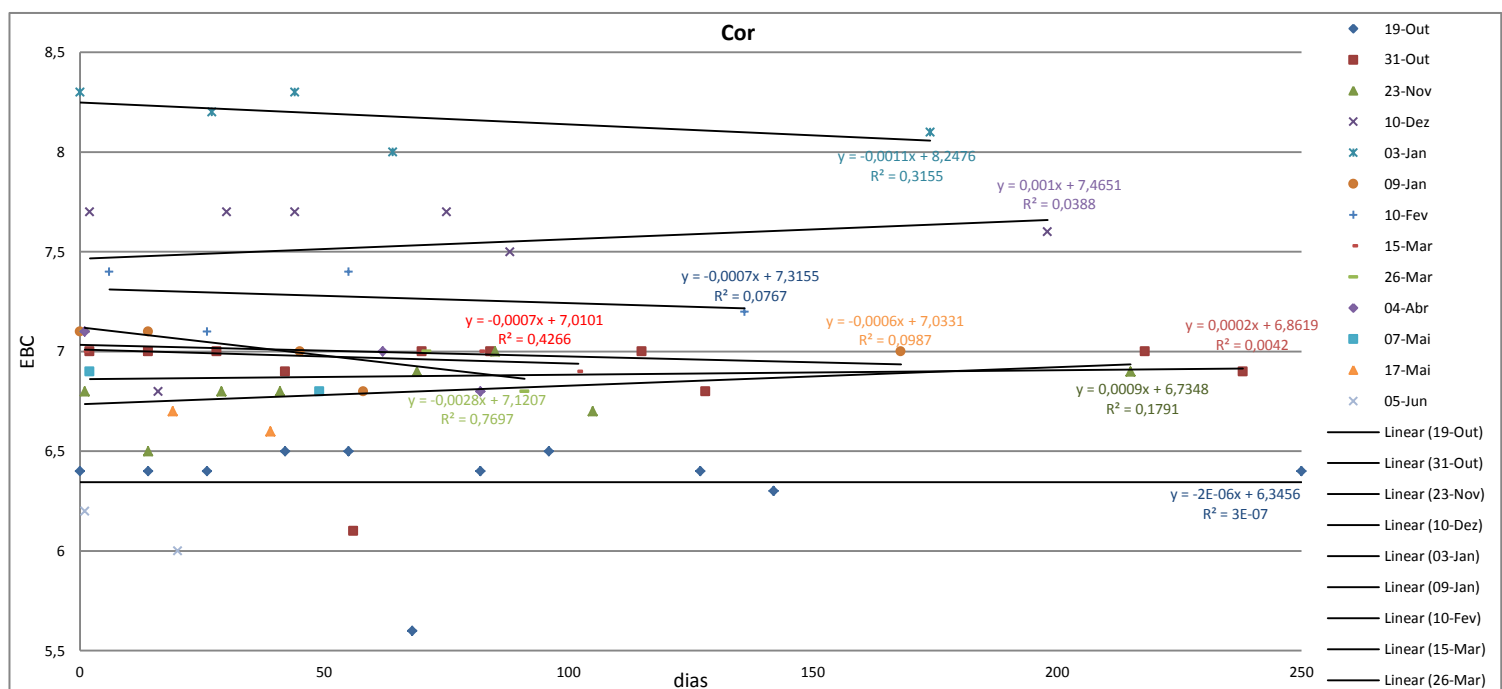


Gráfico 4: Acompanhamento da cor das amostras estudadas.

Podemos concluir pela observação dos dados que as amostras não sofreram escurecimento durante o tempo de armazenagem. As condições não eram propícias à alteração da cor uma vez que a produção de melanoidinas acontece devido às reacções de Maillard e que estas acontecem mais intensamente a temperaturas mais elevadas. No entanto, estas reacções podem ocorrer espontaneamente mesmo a baixas temperaturas.

pH

O pH é um factor de elevada importância no controlo de qualidade de cerveja. A cerveja em estudo tem especificação de valores de pH entre 4,0 e 4,4. Normalmente baixo, o pH da cerveja não favorece o crescimento microbiano. Ao mesmo tempo serve de controlo para avaliar o seu desenvolvimento. Na grande maioria dos casos, como já foi referido, os organismos contaminantes produzem compostos ácidos resultantes do seu metabolismo; fermentações secundárias podem ocorrer nomeadamente fermentação láctica e acética com formação de ácido láctico e acético, respectivamente. Caso houvesse proliferação dos microrganismos, iríamos verificar a acidificação do meio e consequente redução do valor de pH da amostra. Assim o acompanhamento deste parâmetro constitui uma ferramenta valiosa na avaliação da propagação microbiológica.

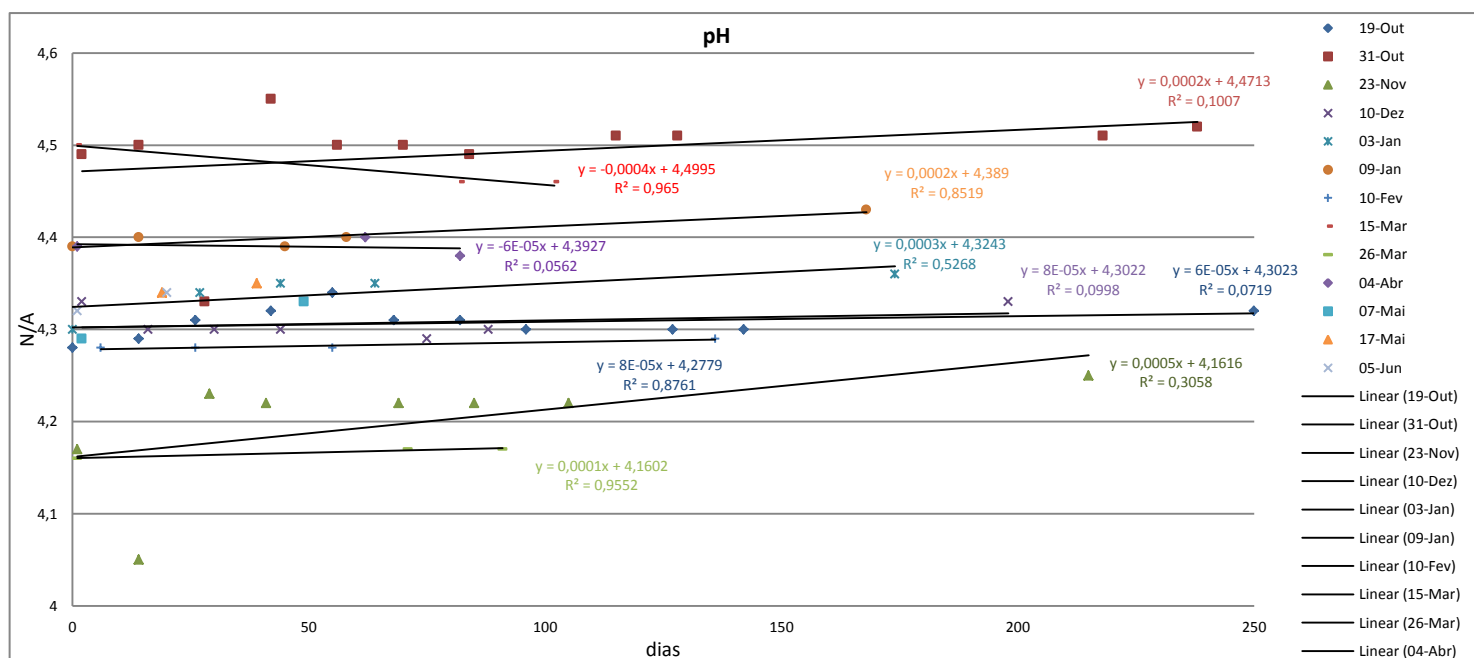


Gráfico 5: Acompanhamento dos valores de pH da cerveja.

Pela observação dos dados obtidos podemos verificar que a variação nos valores de pH não é significativa. Entre lotes existe alguma diferença nos valores de pH mas nenhuma tendência foi verificada durante o acompanhamento. Desta forma, podemos novamente deduzir o comportamento microbiano presente nas amostras: o seu desenvolvimento é limitado, não havendo evidências de produtos resultantes do seu metabolismos.

Estabilidade da Espuma

Apesar do CO₂ ser o responsável pela formação da espuma, a sua estabilidade depende de outros compostos, na sua grande maioria proteínas de elevado peso molecular provenientes do malte e dos ácidos do lúpulo. Outros adjuvantes influenciam a estabilidade da espuma, tais como catiões metálicos que, através de ligações iónicas, reforçam as interacções entre os ácidos iso- α ou polifenóis e polissacarídeos, como por exemplo β -glucanas e arabinoxilanas. Por sua vez, outros componentes tais como lípidos e aminoácidos e elevados níveis de etanol têm um efeito desestabilizador sobre a espuma.^{4,8,9}

Caso houvesse proliferação dos microrganismos, a estabilidade da espuma poderia ser afectada pela degradação das proteínas e outros compostos, convertidos e consumidos pelo metabolismo microbiano. A formação de outros compostos também poderia influenciar a estabilidade da espuma, nomeadamente a formação de álcoois. Também se encontra descrito na literatura que a deterioração química da cerveja, observada ao longo do tempo, resulta num decrescimento no teor de ácidos iso- α do lúpulo, o que pode também influenciar a estabilidade da espuma. Tal facto não se verifica neste estudo em concreto, como poderemos ver mais adiante.

A medição da estabilidade da espuma é feita com a amostra a uma temperatura de 20,0 +/- 0,5 °C através de um aparelho Haffsman NIBEM-T e o limite inferior de especificação são 250 segundos. Os resultados encontram-se expressos no gráfico 6.

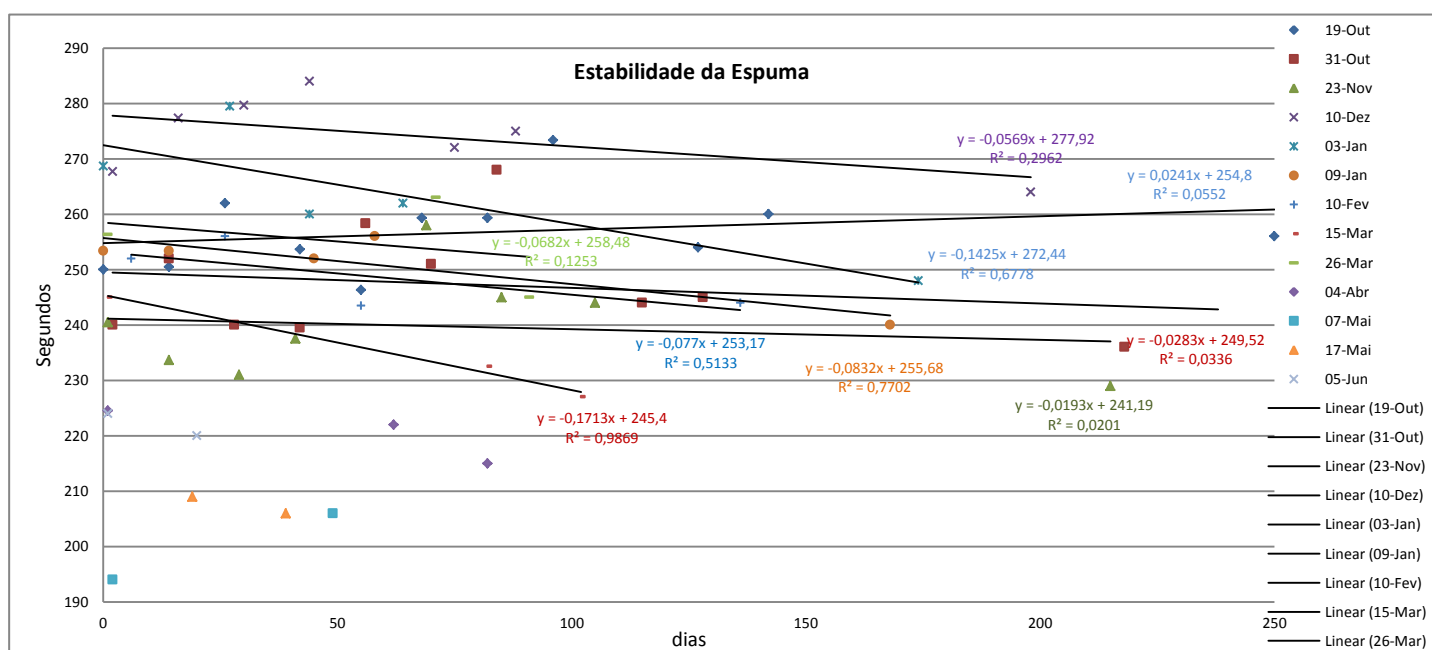


Gráfico 6: Acompanhamento dos tempos de abatimento da espuma das cervejas.

Pela observação do gráfico anterior podemos verificar que existe uma ligeira tendência à diminuição da estabilidade da espuma das amostras. Ao mesmo tempo verifica-se que o tempo de abatimento de certas amostras é, de um modo geral, baixo. Esta situação foi verificada em alguns lotes de produto acabado e o problema foi corrigido nos fabricos a jusante. Ainda assim, a tendência generalizada para a diminuição da estabilidade da espuma terá de ser confirmada uma vez que o erro experimental associado ao método é superior à variação observada entre medições, isto porque o instrumento utilizado para formar a espuma cria espuma com diferentes consistências, sendo necessário haver manutenção quando esta situação se verifica.

Turvação a 20°C

A turvação da cerveja constitui uma importante ferramenta na avaliação da estabilidade coloidal da cerveja. Uma cerveja filtrada tem de ser límpida e brilhante com um limite superior de especificação para a turvação de 0,8 EBC, no caso da cerveja em estudo.

A turvação de uma cerveja pode ter várias origens: numa cerveja pasteurizada, a formação de complexos proteína-polifenóis é a principal razão para o aparecimento de partículas em suspensão que tornam a cerveja menos translúcida e consequentemente mais turva. Pode ocorrer naturalmente ou mais frequentemente pela exposição a alguns ciclos de temperatura inferior a 0° C e superior a 20° C. Este tipo de exposição dará origem ao chamado “chill haze”, característico da formação destes complexos, potenciada pelas diferenças de temperatura.

Neste estudo em concreto, a turvação da cerveja poderia ter outras origens, uma vez que o seu armazenamento ocorreu a uma temperatura constante de 7° C. Para além disso, o processo de filtração após a fermentação, inclui adjuvantes que visam em concreto a retenção de proteínas e polifenóis.

A presença de microrganismo poderia significar um aumento na turvação da cerveja, sendo a própria proliferação microbiana a maior causa de turvação, onde os próprios organismos contaminantes evitariam a passagem de luz e consequentemente aumentavam a turvação da cerveja.

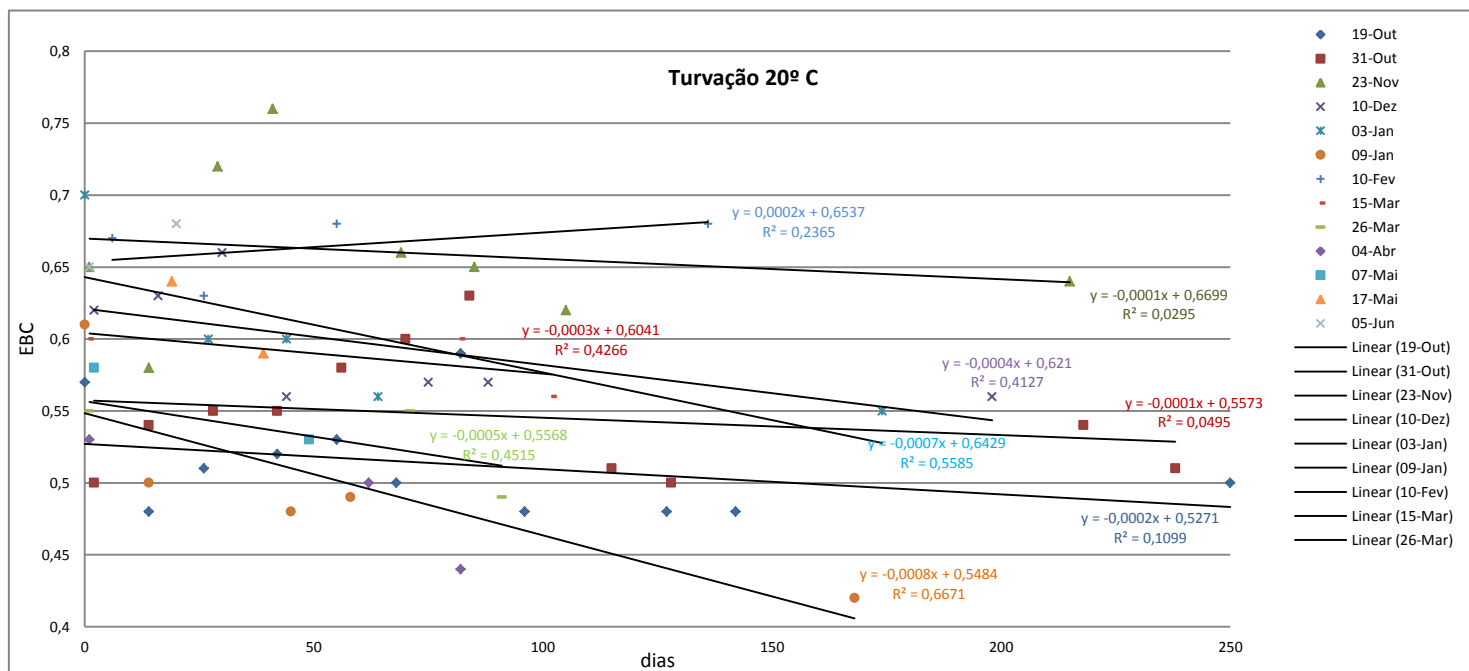


Gráfico 7: Acompanhamento dos valores de turvação das amostras.

Os resultados obtidos permitem-nos comprovar que as amostras não sofrem efeitos da proliferação dos organismos, não se verificando um aumento ao longo do tempo. Mais uma vez, serve de prova que os microrganismos não conseguiram difundir-se no interior das garrafas, nas condições a que foram sujeitos.

Concentração de CO₂

O dióxido de carbono na cerveja não só é um parâmetro controlado ao nível sensorial mas também ao nível físico-químico. Uma cerveja deste tipo tem de ter uma concentração de CO₂ compreendida entre os 4,9 e 5,6 g/l. Este composto desempenha um importante papel no controlo microbiológico porque, não só permite que, na teoria, apenas os microrganismos anaeróbios se desenvolvam, mas também porque é o principal responsável pela elevada pressão interna da garrafa. Em contraposição, a difícil higienização do sistema de reincorporação de CO₂ na cerveja em guarda, por vezes torna-se uma fonte de contaminação do produto, não podendo estar armazenado no TCF por um período superior a 5 dias.

O acompanhamento do teor de CO₂ na cerveja em estudo foi motivado pelo facto de que este é um produto secundário resultante da fermentação e por esse motivo, um indicador da refermentação da amostra realizada pelos microrganismos nela presentes. Um medidor automático de CO₂ Carbo QC foi utilizado para medir a concentração da molécula nas cervejas em estudo.

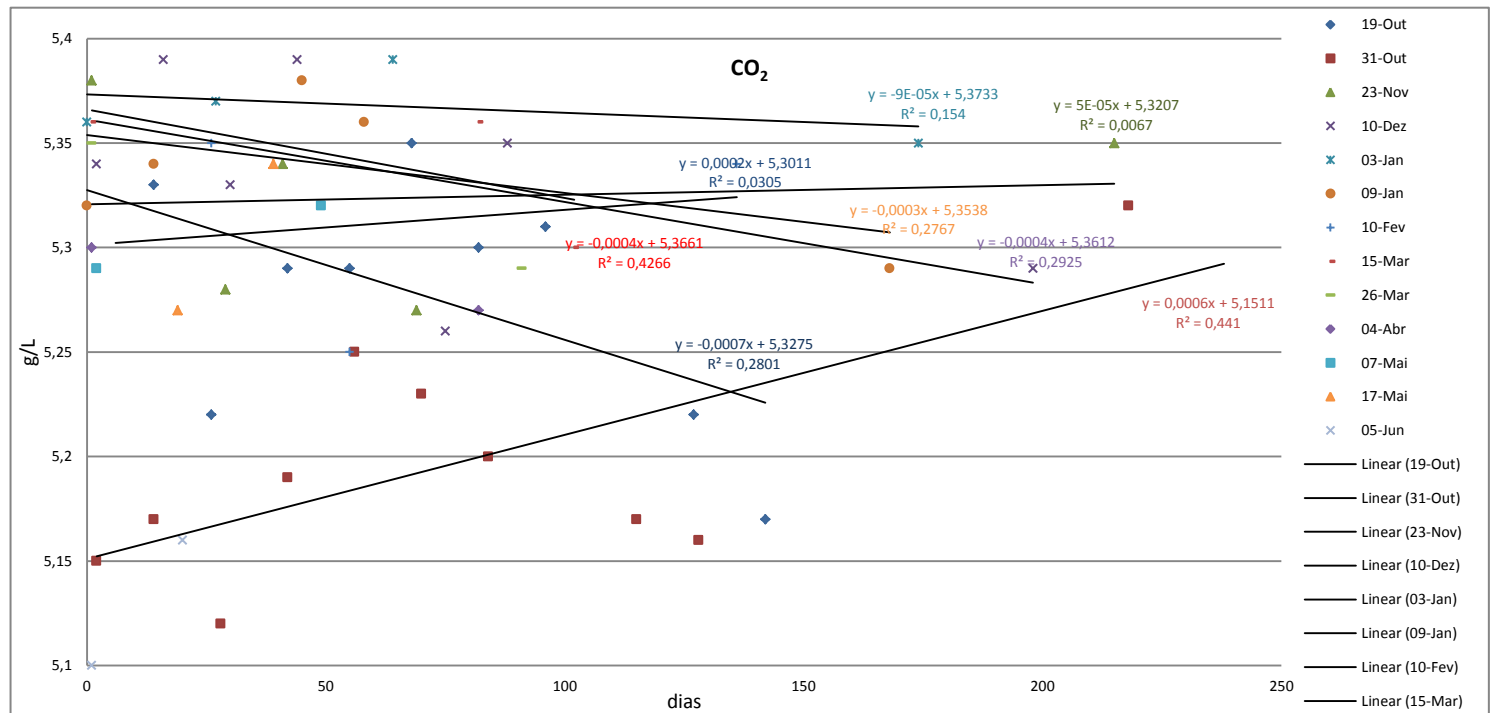


Gráfico 8: Acompanhamento dos valores da concentração de CO₂ nas cervejas.

Podemos verificar que a concentração de CO₂ manteve-se constante nas amostras, não havendo aumento ou diminuição do seu teor. Em consonância com os restantes resultados, pode-se concluir que não teve lugar uma refermentação da cerveja apesar da presença de microrganismos.

Amargor ou teor em ácidos iso- α do lúpulo

A diminuição do amargor durante a armazenagem da cerveja a temperaturas elevadas coincide com uma deterioração progressiva das características amargas da cerveja. A concentração de oxigénio na cerveja tem uma influência clara na degradação do ácido iso- α . No caso deste estudo em concreto, uma vez que não se depara directamente nenhum destes parâmetros concretamente, verificou-se de que forma o teor em ácido iso- α era influenciado na cerveja não pasteurizada através do método espectrofotométrico de medição de substâncias amargas da cerveja.

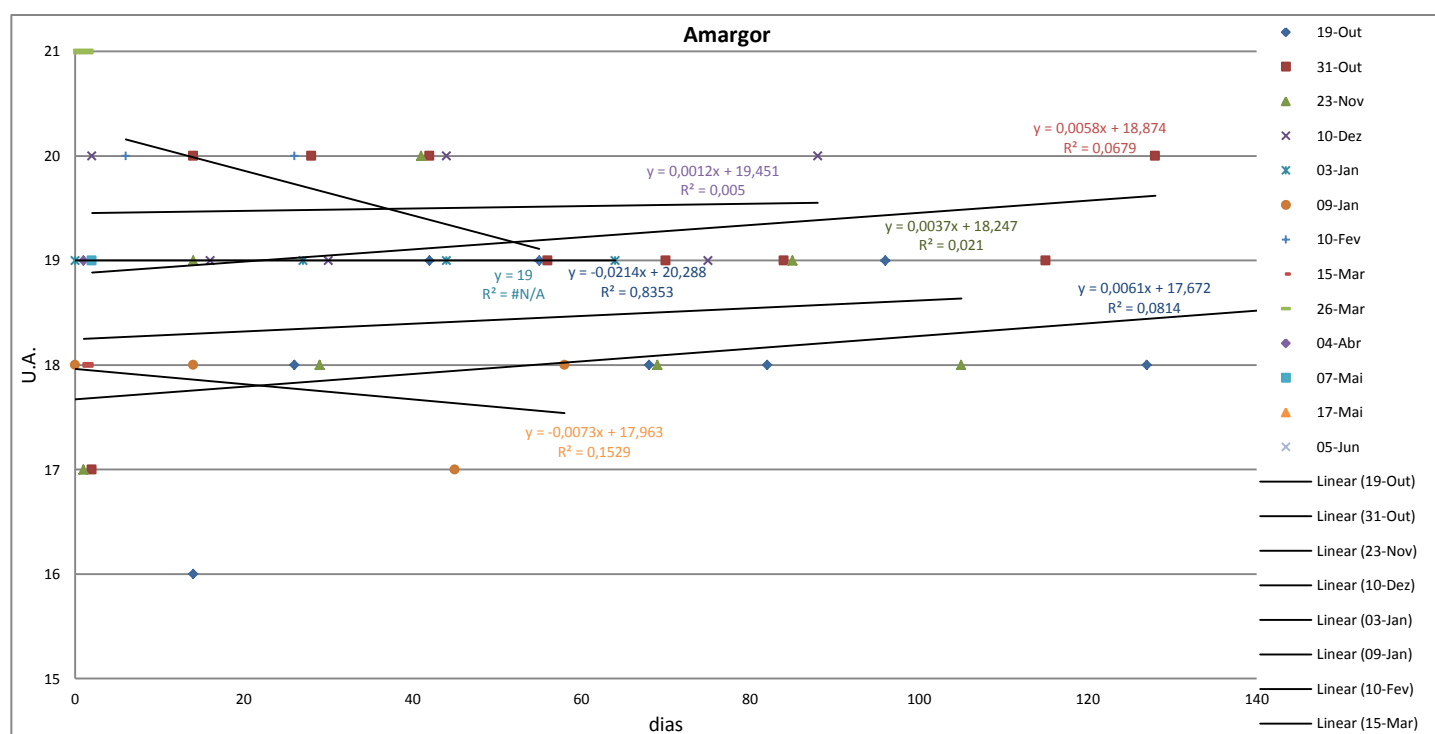


Gráfico 9: Acompanhamento do teor de ácidos iso α nas amostras.

Podemos concluir pela análise dos dados que o teor em ácidos iso α do lúpulo não apresentou variações significativas durante o período do estudo, não tendo sido influenciado pelas condições em que o ensaio decorreu.

Análise Sensorial

Neste estudo, a análise sensorial foi efectuada através da prova das amostras por um painel de 5 provadores oficiais, onde era efectuado semanalmente o controlo organoléptico a todas as 13 amostras, simultaneamente. Os provadores não sabiam a ordem das amostras e faziam a sua avaliação com base nos aromas e sabores estranhos detectados para este tipo de cerveja. O provador registava o aroma/sabor estranho e quantificava-o com base na sua intensidade: 1-ligeiro; 2-moderado e 3-forte. A sua avaliação global era feita numa escala de com intervalo de 0,5 pontos e decresce desde o +1 para um produto de óptima qualidade; 0 - normal para este tipo de produto; -1 quando tem defeitos aceitáveis; -2 com defeitos não aceitáveis até ao -3 para uma amostra com defeitos que requerem acção imediata.

As médias dos resultados obtidos na prova eram registadas, com base no número de dias a contar desde o dia do enchimento do lote em questão, e simultaneamente o termo associado ao defeito detectado era igualmente registado de forma a se poder verificar alguma tendência no aumento ou diminuição nos aromas/sabores detectados. De salientar que o envelhecimento da cerveja, tal como se encontra descrito a cima, é caracterizado por um aumento da doçura da cerveja e diminuição do amargor. Outro termo utilizado para caracterizar uma cerveja envelhecida é o sabor a “papel/cartão”, sabor característico do E-2-nonenal quando o seu limiar de detecção é ultrapassado.

Para além dos sabores característicos do envelhecimento da cerveja, neste caso em concreto, por se tratar de cerveja não pasteurizada, o aroma e sabor da cerveja poderá sofrer alterações devido à produção de novos compostos ou aumento dos já existentes para além do seu limiar de detecção, bem como redução dos compostos que conferem frescura à cerveja, pela degradação através do metabolismo dos microrganismos. A alteração das características pode ser igualmente indirecta, havendo reacções secundárias dos metabolitos originados com as moléculas já presentes na cerveja.

Desta forma, os dados foram tratados em separado, acompanhando-se independentemente lote a lote, e também se procedeu à uniformização do controlo, distinguindo apenas a média das avaliações globais pelo número de dias desde o seu enchimento.

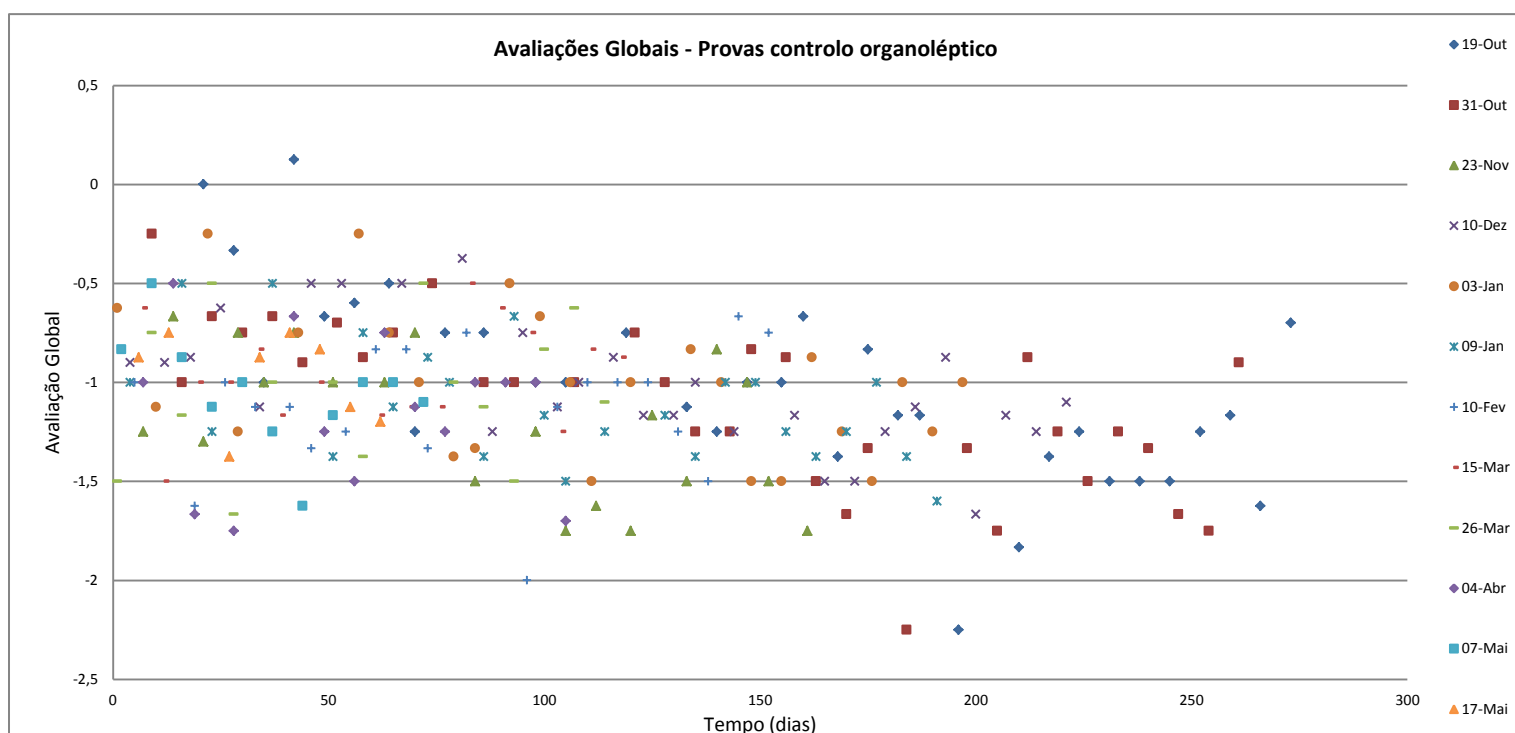


Gráfico 10 - Compilação dos gráficos com a média das avaliações globais distinguidas pela data do enchimento.

Podemos observar no gráfico em cima representado a compilação das avaliações globais obtidas nas provas de controlo organoléptico. Cada conjunto de pontos representa a média das avaliações globais por enchimento.

Uma vez que se torna complexo avaliar individualmente os lotes e sendo o âmbito do estudo a avaliação da cerveja na sua globalidade, compilou-se os resultados médios num gráfico, sem diferenciação pelo lote, obtendo-se uma nuvem que expressa uma tendência do comportamento generalizado da cerveja não pasteurizada. Para além disso, as curvas de tendência dos enchimentos mais recentes e com menos avaliações em prova, não expressam a realidade observada, comparando-se com os enchimentos mais antigos.

Assim sendo, o gráfico seguinte compila as mesmas avaliações médias acima representadas, sem diferenciação do lote, e simultaneamente o cálculo da média da avaliação global caso haja mais do que uma avaliação com o mesmo número de dias.

A curva de tendência compreende uma aproximação do comportamento e da avaliação da cerveja não pasteurizada em prova.

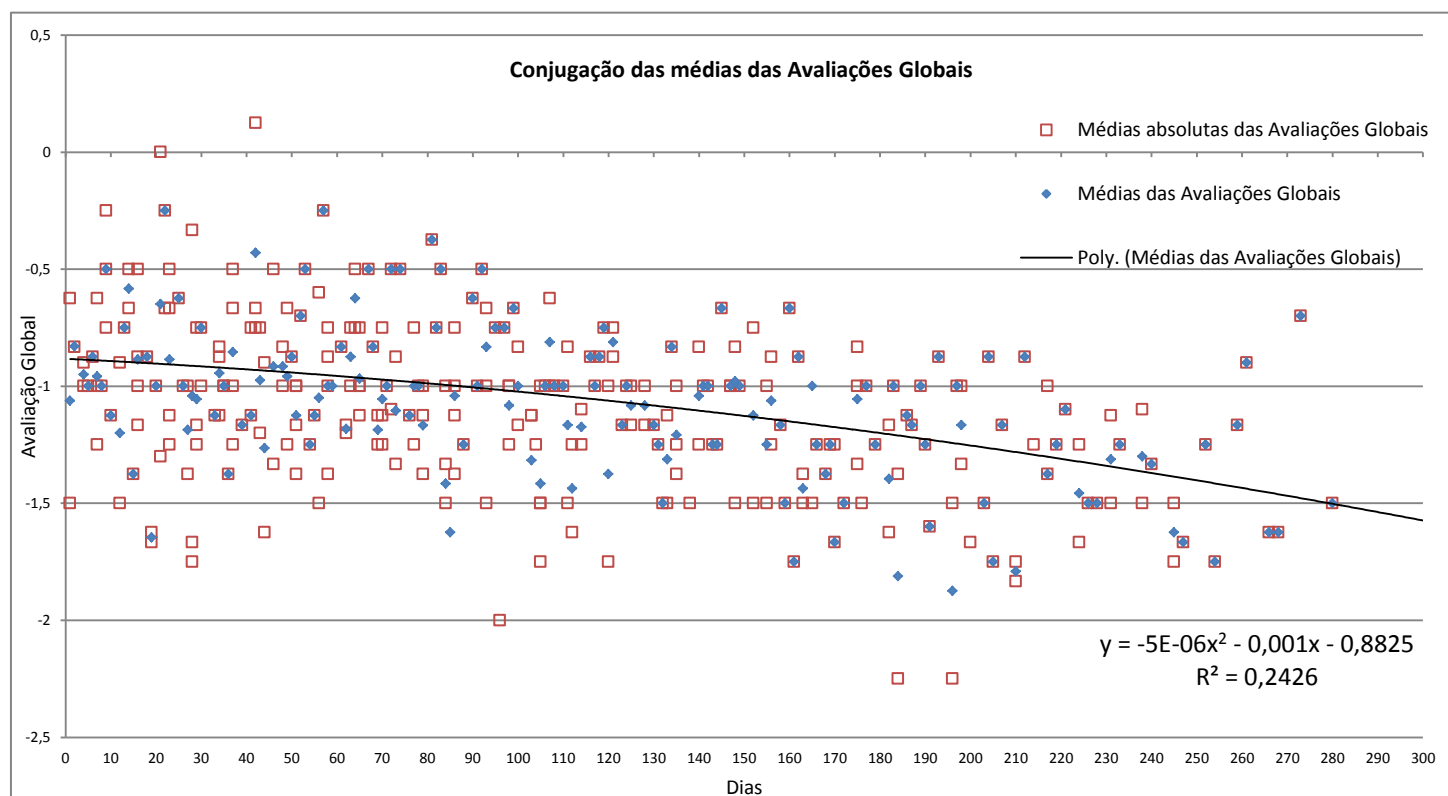
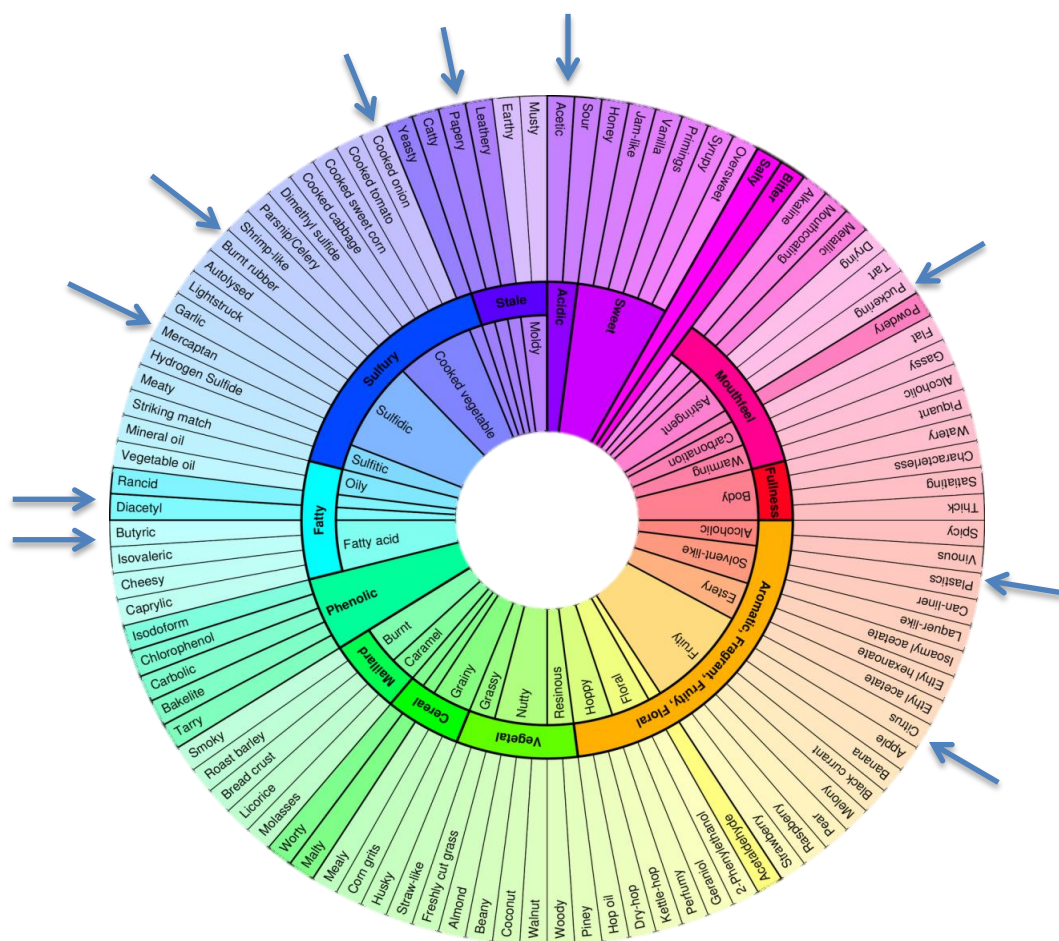
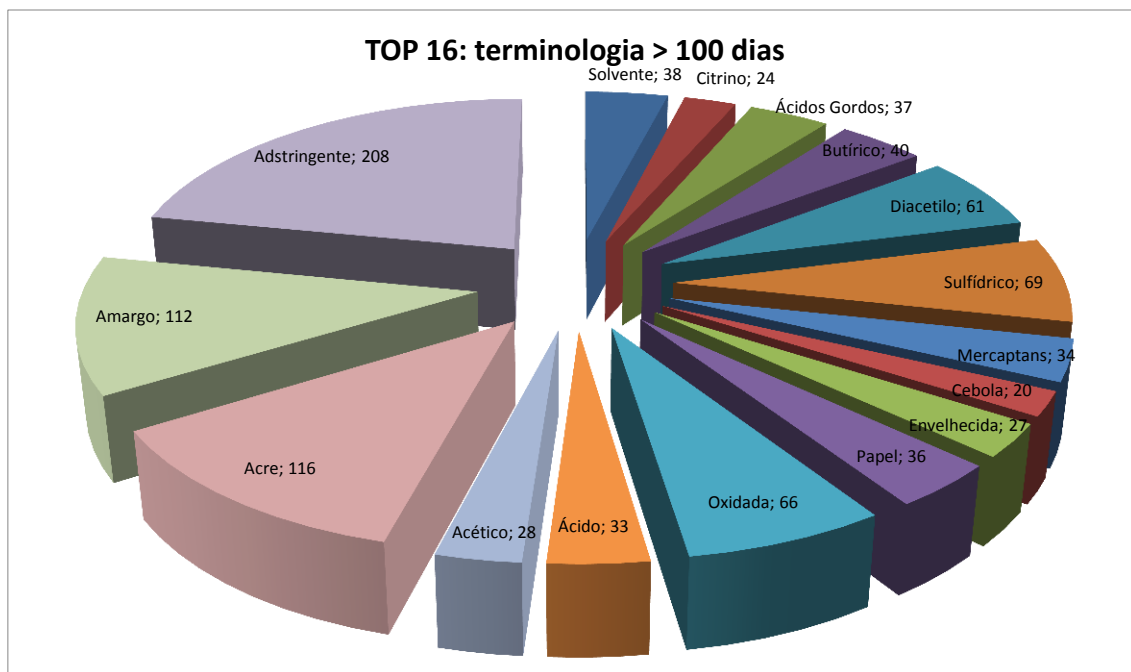


Gráfico 11 - Conjugação das avaliações globais absolutas e valores médios dos mesmos valores absolutos.

Podemos observar pelo gráfico acima representado a evolução da redução da qualidade sensorial da cerveja não pasteurizada. De um modo geral, os valores médios iniciais situam-se entre o -0,5 e -1. Podemos verificar que ao fim de 90 dias, a média absoluta das avaliações globais é igual a -1. Só ao fim de 280 dias é que a linha de tendência cruza o eixo horizontal que representa o -1,5 de avaliação global média.

Este estudo torna-se valioso uma vez que se consegue visualizar a tendência na sua globalidade da cerveja não pasteurizada em garrafa e armazenada a uma temperatura constante de 7° C. O gráfico revela a perda de qualidade natural da cerveja com o tempo, o que valida o método de controlo aplicado. Simultaneamente, podemos comprovar que apesar de conter microrganismos no meio, não houve uma produção considerável de aromas ou sabores *off* que iriam seguramente levar o provador a avaliar de forma mais negativa o produto em prova.



Pela observação do gráfico e da figura representados podemos notar a predominância de certos termos utilizados para descrever a cerveja não pasteurizada. Foram referenciados os mais predominantes em cerveja ao fim de 100 dias para melhor representar que influência tem a presença de microrganismos no carácter organoléptico da cerveja, evitando a alusão a certos termos característicos de cervejas que potencialmente tivessem uma maior predominância de termos não característicos de cerveja envelhecida.

Podemos verificar pela roda de Meilgaard que há uma preponderância de termos associados ao envelhecimento e à presença de microrganismos, nomeadamente de composto sulfurados e ácidos gordos. Estes compostos provêm na sua maioria do metabolismo microbiano. Ao mesmo tempo, podemos comprovar a latência do metabolismo uma vez que a evidência destes termos não é manifestada imediatamente nem de forma excessiva, caso se tratasse de um processo de deterioração por contaminação evidente e imediato.

Conclusões

No âmbito da avaliação do impacto da remoção do processo de pasteurização em cerveja em garrafa, podemos concluir com base nos resultados microbiológicos que o produto cheio e capsulado apresenta uma vasta variedade de organismos contaminantes que não se encontram no produto acabado devido ao processo de pasteurização em túnel a que é sujeito. Para além disso, é de salientar a diferença entre os enchimentos no que se refere a UFC por volume de amostra. Mesmo mantendo o mesmo método de recolha, ou seja, imediatamente a seguir à enchedora da mesma linha, podemos observar essas diferenças que podem ser justificadas pelo facto de existirem diversos CIP nas diferentes fases do processo mas não são realizados em simultâneo o que pode explicar alguma da variedade microbiana observada. Também o facto de a garrafa ser apenas “soprada” antes do seu enchimento, não garante a esterilização da mesma, chegando à enchedora com microrganismos que entram em contacto com o seu interior desde a sua produção, no transporte e pelo ar já na linha de enchimento. As cápsulas também podem incorporar alguns microrganismos, uma vez que são conduzidas automaticamente através de tapetes magnéticos até à zona de capsulação, expostas ao ar e sem condições de assepsia.

Tendo sido verificada a presença e grande diversidade de microrganismos nas amostras em estudo, pode-se concluir pelas diversas análises físico-químicas efectuadas, que a presença de microrganismos, em oposição às amostras pasteurizadas que são analisadas de forma recorrente no laboratório de controlo de qualidade, não apresentou diferenças significativas ao longo do estudo, salientando-se por este motivo o poder bacteriostático da cerveja.

Por se tratar de um produto à base de água com etanol, pH baixo, teor reduzido de O_2 e elevado teor de CO_2 , com reduzida concentração de açúcares fermentescíveis ainda presentes e com ácidos isomerizados provenientes do lúpulo, a cerveja apresenta-se como uma bebida com elevado poder bacteriostático, evitando a proliferação de microrganismos no seu interior. Desta forma, inviabiliza a capacidade de deterioração destes, mantendo as características da cerveja estabilizadas e os parâmetros de controlo de qualidade inalterados por um período de até 260 dias, altura em que a amostra mais antiga foi analisada.

Os métodos de controlo físico-químico utilizados basearam-se nos procedimentos habituais de verificação de qualidade, e uma vez que não houve alterações

significativas nestas características, um exame mais aprofundado e direccionado a determinados compostos através de HPLC ou GC-MS poderá ter um papel mais elucidativo quanto ao processo de deterioração da cerveja não pasteurizada.

A prova foi considerada a ferramenta mais valiosa para avaliar o impacto da exclusão do processo de pasteurização, tendo-se conseguido uma importante associação dos termos mais utilizados com a deterioração provocada pelos microrganismos. Ao mesmo tempo, a experiência dos provadores foi fundamental para o estudo, uma vez que são capazes de detectar aromas ou *off flavours* muito perto do ser limiar de detecção e muito antes do consumidor comum os pressentir. Por este mesmo motivo, pode-se concluir que a presença dos microrganismos contaminantes não representa um perigo para a qualidade sensorial do produto, caso a cerveja cumpra as restantes especificações de qualidade e armazenada sobre estas condições.

Avaliação do trabalho realizado

Objectivos Realizados

Com este estudo foi possível fazer uma abordagem directa a um tipo de cerveja em específico, verificando-se as suas características particulares, servindo-se dos resultados obtidos como rampa de lançamento para novos estudos, nomeadamente novos métodos de estabilização.

Limitações e trabalho futuro

Considerando este estudo como um ponto de partida para uma melhor compressão dos factores limitantes e preditivos de estabilidade da cerveja, novos métodos poderão ser abordados, avaliando a influência de outros factores na deterioração de cerveja não pasteurizada, nomeadamente empregando temperaturas de acondicionamento mais elevadas, estudo da actividade enzimática, alteração controlada das características da cerveja e avaliação do seu impacto e identificação dos principais compostos formados em oposição à cerveja pasteurizada. Para além disso, a diversidade microbiana foi verificada mas não identificada. Uma análise de PCR ou FISH pode apresentar um importante avanço não só na identificação dos microrganismos mas também no reconhecimento da proveniência e da fonte de contaminação dos mesmos.

Outros trabalhos Realizados

Durante o período de estágio na Unicer, foi-me dada a possibilidade de participar e desenvolver outros trabalhos, envolvendo diferentes áreas e abordagens metodológicas variadas. Alguns desses trabalhos encontram-se descritos abaixo.

Avaliação do impacto da redução das UP em dois tipos de cerveja preta

O âmbito deste estudo foi a avaliação do impacto da redução de UP em cerveja preta. Estas cervejas possuíam um processo de pasteurização mais intenso, sendo os limites de especificação mais elevados que as cervejas brancas produzidas na Unicer. O objectivo do estudo era a uniformização do processo de pasteurização, a redução de bloqueios por UP's fora do limite de especificação e verificar qual seria o impacto no perfil organoléptico da implementação do novo método.

Para a validação do método, foi necessário verificar a taxa de redução decimal dos microrganismos presentes nestes 2 tipos de cerveja em específico. Para tal, foram recolhidas amostras sujeitas a diferentes intervalos de tempo a uma temperatura de 62° C, sendo medidas as UP de cada uma das amostras. As amostras foram analisadas pelo método de filtração em rampa para incubação e contagem de UFC. Foi feito o cruzamento dos dados e obtiveram-se os gráficos seguintes para os 2 tipos de cerveja preta, A e B.

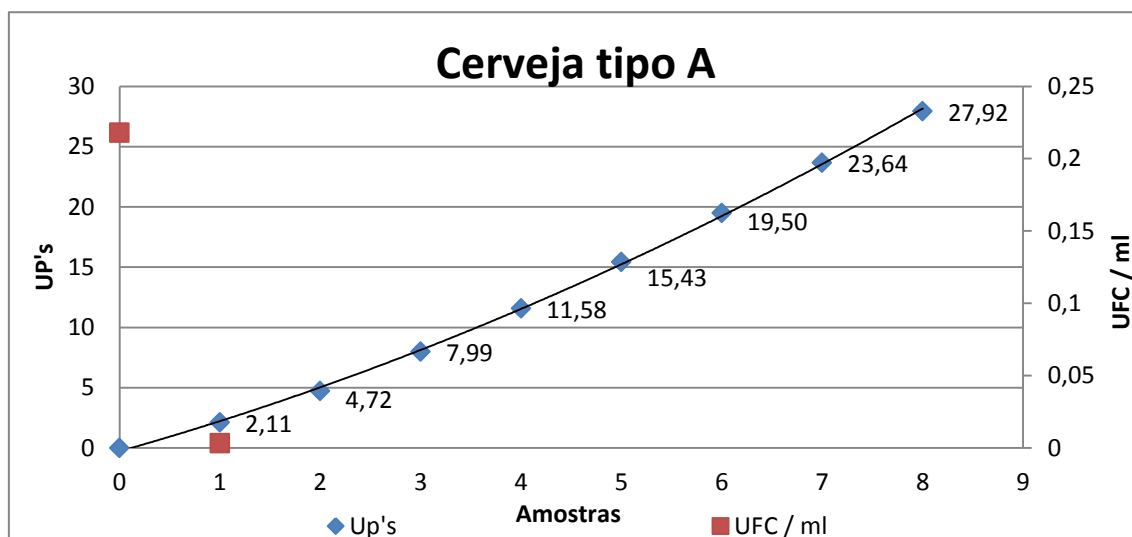


Gráfico 13: Contagem das UFC em relação às UP a que a cerveja foi sujeita.

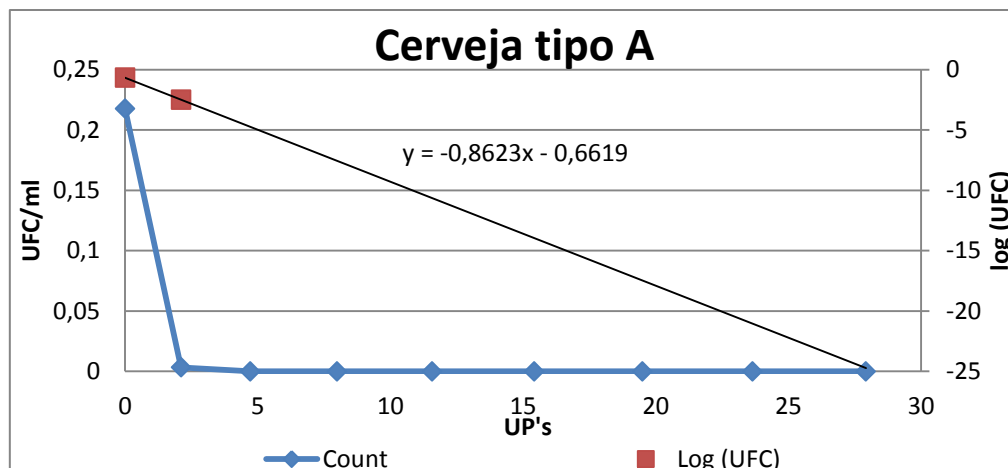


Gráfico 14: Redução logarítmica das UFC em relação às UP praticadas.

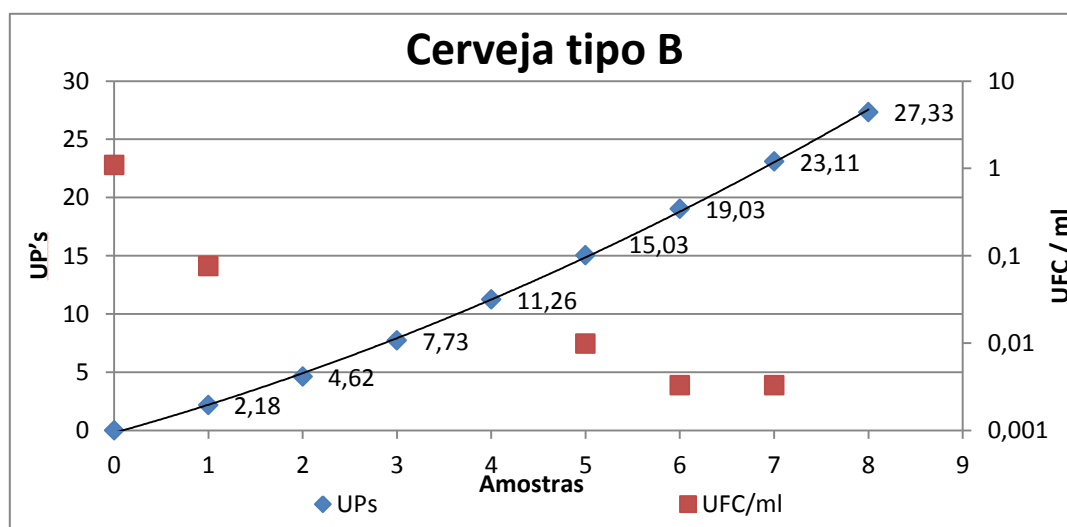


Gráfico 15: Contagem das UFC em relação às UP a que a cerveja foi sujeita.

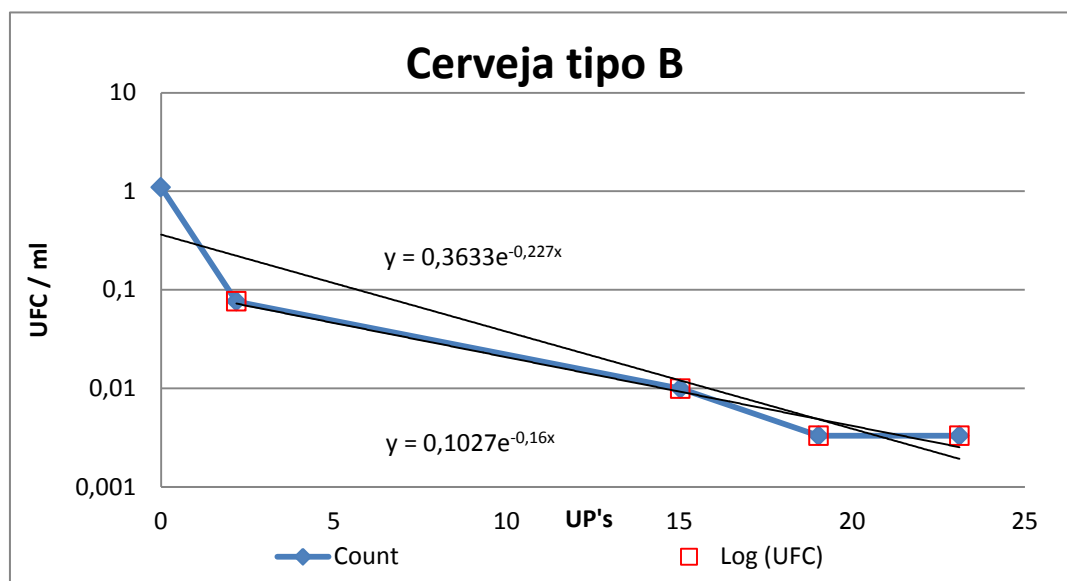


Gráfico 16: Redução logarítmica das UFC em relação às UP praticadas.

Pela observação dos gráficos acima representados podemos verificar que se consegue obter estabilidade microbiológica mesmo praticando programas de pasteurização que pratiquem UPs mais baixas.

Por uma questão de uniformização do processo, pensou-se aplicar o programa de pasteurização para as cervejas brancas igualmente para este tipo de cervejas. A aplicação deste método iria ter diversas implicações benéficas, nomeadamente a redução de bloqueios de produtos fora do limite de especificação, uma vez que, em média por ano, verificam-se aproximadamente 15 bloqueios por UP abaixo do limite de especificação que seriam evitados caso os limites de especificação praticados fossem os de cerveja branca. Ao mesmo tempo iriam-se evitar 97 alterações anuais do programa de pasteurização, que implica, no caso de mudança para um programa de menos UP, um gasto extra de água fria para o arrefecimento do pasteurizador, e de um consumo extra de vapor para o aquecimento do pasteurizador, caso se tratasse de uma mudança para um programa de pasteurização que infligisse mais UP à cerveja. Simultaneamente, a prática do programa de pasteurização para UP mais baixas implicaria a redução do consumo de vapor utilizado no aquecimento da água do chuveiro do túnel de pasteurização.

Foi feito o acompanhamento dos gastos de vapor no processo de pasteurização de ambos os programas nas diferentes linhas de enchimento e os resultados expressos graficamente encontram-se abaixo representados.

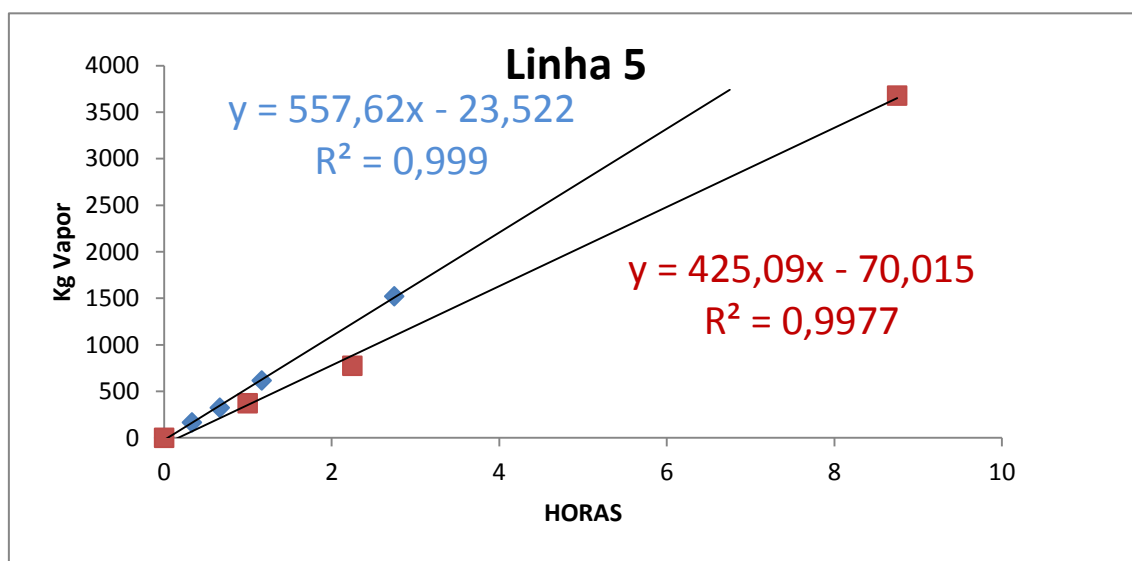


Gráfico 17: Comparação do consumo de vapor dos programas de pasteurização - L5

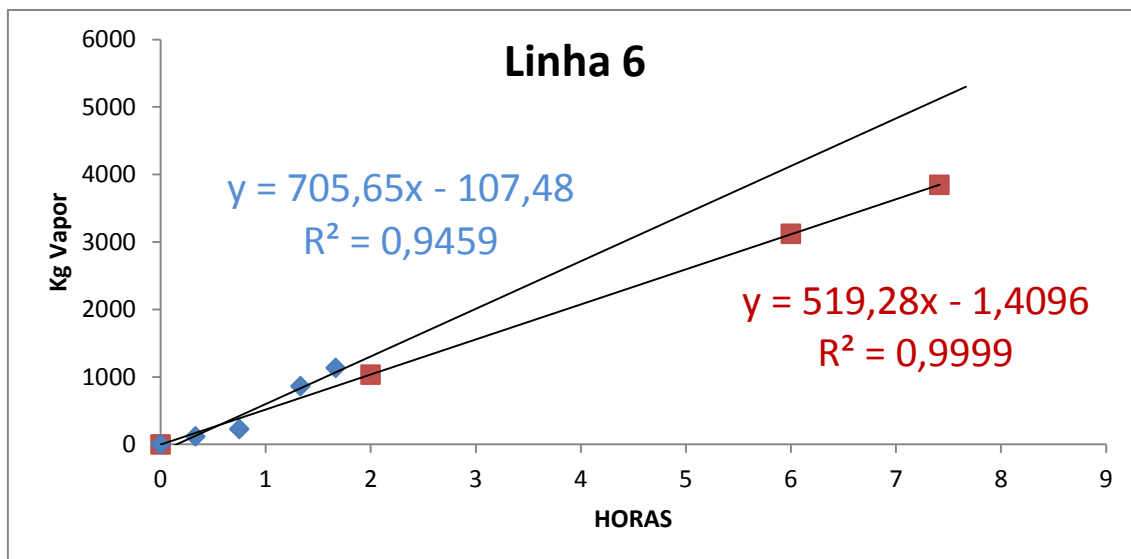


Gráfico 18: Comparação do consumo de vapor dos programas de pasteurização - L6

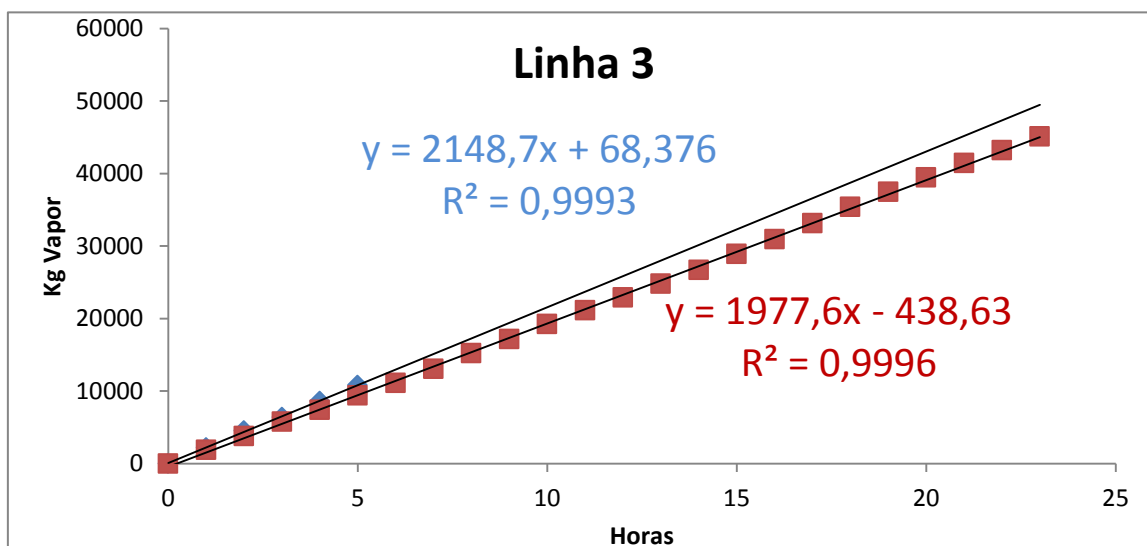


Gráfico 19: Comparação do consumo de vapor dos programas de pasteurização - L5

Podemos observar a diferença do consumo horário de vapor nas diferentes linhas entre os 2 tipos de programa de pasteurização. É evidente a redução do consumo de vapor entre os programas, o que obrigatoriamente implica menos gastos e um impacto ambiental reduzido.

A validação da implementação do novo programa de pasteurização para estes 2 tipos de cerveja viria da análise sensorial do produto, onde foi realizado um teste triangular com as amostras sujeitas a diferentes UP, as quais não revelaram diferenças significativas entre si, podendo-se avançar para a implementação do novo método.

Estudo da aplicação da tecnologia de HPP em cerveja

Nos últimos anos, vários estudos foram conduzidos no âmbito da estabilização microbiológica de cerveja e vinhos através da tecnologia de HPP.

Nos laboratórios tecnológicos da Universidade de Aveiro fizeram-se alguns ensaios de estabilização recorrendo a esta tecnologia, com amostras de cerveja não pasteurizada em *vials* de 30 ml sujeitos a 400 MPA durante 10 minutos à temperatura de 10° C.

Os resultados foram inconclusivos uma vez que era difícil manter as amostras dentro dos *vials* devido ao CO₂ da cerveja. Os *vials* apropriados para a exposição a altas pressões não se revelaram eficientes a vedar as amostras do meio exterior, tornando por isso impossível concluir acerca dos resultados obtidos.

Pensou-se recorrer à descarbonatação das amostras por agitação mas seria uma alteração não desejada para o produto. Igualmente o reduzido volume de amostra verificou-se incomportável para a análise sensorial bem como análise físico-química e microbiológica a realizar no laboratório de controlo de qualidade da Unicer.

Novos ensaios poderão ser efectuados quando maiores volumes de amostra poderem ser processados a alta pressão com um novo equipamento de HPP a adquirir pela UA no próximo ano de 2013.

MPA - Métodos Preditivos de Análise

Neste projecto procura-se desenvolver o conhecimento básico das matérias-primas e das condições de fermentação de modo a criar uma solução integrada que permita deduzir, de forma rápida e fiável, como decorrerá a fermentação na instalação industrial.

Um lote de malte utilizado para a produção industrial de mosto não é constituído apenas por uma variedade de malte, trata-se de uma mistura de várias variedades de malte, ou sub-lotes, que permitem adequar o conjunto às especificações requeridas pela empresa produtora de cerveja. Desta forma, cada lote tem características físico-químicas diferentes, mesmo correspondendo às directrizes.

Este projecto rege-se pelos seguintes objectivos:

- Avaliação do teor em aminoácidos e iões nos mostos produzidos, comparando-os com base no teor de FAN dos maltes e na instalação onde decorreu o fabrico (Instalação Piloto vs Mini-fábrica vs Fabrico Industrial);
- Caracterização do azoto disponível para a levedura (*yeast available nitrogen - YAN*) em mostos obtidos a partir dos sub-lotes de malte de cevada;
- Comparação do perfil de YAN dos mostos obtidos dos sub-lotes com o mosto produzido na unidade industrial de lotes compostos;
- Avaliar a influência do teor de FAN no desempenho fermentativo da levedura US nos tubos EBC-2l;
- Desenvolver um modelo de avaliação com base na informação recolhida em fermentações e perfis de YAN e FAN de maltes que permita prever o desempenho da fermentação;
- Aplicar o modelo desenvolvido para a criação de especificações para a aceitação de malte de cevada;

Para ser possível atingir os objectivos estabelecidos definiu-se uma estratégia que rege todo o trabalho experimental a realizar no Laboratório Central bem como análises externas que seja necessário requerer.

Esta estratégia baseia-se nos seguintes pontos:

- Realização de fermentações em triplicado de cada sub-lote de mosto em condições padrão e acompanhamento adequado no decorrer das fermentações;
- Análise de componentes azotados incluindo o perfil de aminoácidos de cada sub-lote de malte e correlacionar com o desempenho da fermentação;

- Utilização de levedura propagada no laboratório, mantendo o mesmo estado fisiológico em todas as fermentações.

Notas e referências

A capacidade de uma levedura metabolizar os componentes azotados de um mosto é uma questão que deu origem a um grande número de artigos de investigação e outra literatura científica, já que este tópico tem impacto directo no desempenho das empresas produtoras de cerveja. Por outras palavras, existe um sério interesse económico na caracterização do consumo de azoto pelas leveduras cervejeiras.

Estes estudos deram origem a alguns parâmetros que hoje em dia são utilizados como análises de referência ao malte obtido:

YAN: *Yeast available nitrogen*, trata-se da designação geral que inclui a concentração de iões amónia, ureia, a cadeia lateral de L-arginina e o PAN;

- PAN: *Primary amino nitrogen*, consiste no azoto que é obtido a partir das aminas primárias de aminoácidos;

FAN: *Free amino nitrogen* - soma de aminoácidos individuais e pequenos péptidos formados durante a maltagem ou da cevada não maltada.

Caracterização dos aminoácidos do mosto com base na importância como reguladores do desenvolvimento dos metabolitos aromáticos da cerveja ²⁰.

Na generalidade, os mostos constituídos apenas por maltes da mesma variedade utilizados para a produção de cerveja, possuem um perfil de aminoácidos relativamente constante. No entanto, com a utilização várias variedades, o equilíbrio do perfil de aminoácidos pode ser alterado com consequências óbvias.

Jones e Pierce elaboraram uma classificação por grupos em que separam os aminoácidos em função dos padrões de assimilação destes mostos. ²⁰

Group A Fast absorption	Group B Intermediate absorption	Group C Slow absorption	Group D Little or no absorption
Glutamic acid	Valine	Glycine	Proline
Aspartic acid	Methionine	Phenylalanine	
Asparagine	Leucine	Tyrosine	
Glutamine	Isoleucine	Tryptophan	
Serine	Histidine	Alanine	
Threonine		Ammonia	
Lysine			
Arginine			

Tabela 5: Caracterização dos aminoácidos de acordo com o padrão de assimilação. ²⁰

Os aminoácidos do grupo A são assimilados imediatamente após o contacto da levedura com o mosto, enquanto os aminoácidos do grupo B são absorvidos mais lentamente. Os aminoácidos do grupo C apenas começam a ser assimilados quando os aminoácidos do grupo A já desapareceram do mosto. A Prolina é o único elemento da classe D, o que significa que não é assimilado. Este facto é consequência da inexistência de uma oxidase mitocondrial que não existe em condições anaeróbias.

No entanto, apesar da velocidade ou momento de absorção e assimilação dos aminoácidos é necessário ter em consideração outros factores para estabelecer um certo grau de relevância dos aminoácidos para o sucesso da fermentação. Considera-se uma fermentação bem-sucedida se apresenta parâmetros de consumo de hidratos de carbono e produção de álcool adequados e se ocorreu produção ou eliminação de metabolitos com importância para o perfil organoléptico.

A tabela seguinte resume a importância relativa dos aminoácidos:

Class 1	Class 2	Class 3
Aspartate	Isoleucine	Lysine
Asparagine	Valine	Histidine
Glutamate	Phenylalanine	Arginine
Threonine	Glycine	Leucine
Serine	Tyrosine	
Methionine		
Proline		

Tabela 6: Caracterização dos aminoácidos de acordo com sua classe.²⁰

A concentração inicial dos aminoácidos da classe 1 é considerada pouco importante, uma vez que podem ser assimilados do mosto ou sintetizados através de reacções de catabolismo do açúcar e reacções de transaminação. Por outro lado, deficiências nas classes 2 e 3 têm um grande impacto: a lisina e a metionina, por exemplo, foram identificadas como aminoácidos chave na fermentação de mosto.²⁰

Caracterização do mosto

Protocolo de produção do mosto

Os maltes em estudo foram usados para a produção de mosto na unidade Piloto (Unicer, Leça do Balio) de acordo com o protocolo interno. Pretendia-se que os mostos possuísem um extracto alvo de 15 a 16°P. Os mostos são nomeados pela cevada que lhes deu origem no caso de serem monovarietais. O mosto que corresponde a uma mistura de maltes é denominado Composto. A informação relevante encontra-se na seguinte tabela.

Tabela 7 - Características da cevada utilizada nos mostos monovarietais e características do mosto de mistura.

Cevada	Tipo	Plantação	<i>Versement</i>
Pewter	Dística	Primavera	
Braemar	Dística	Primavera	
Esterel	Hexástica	Inverno	
Prestige	Dística	Primavera	
Composto			45% Pewter, 15%Prestige, 15% Braemar, 20%Esterel

Tabela 8 - Caracterização das amostras de mosto produzidos com o malte em estudo.

Parâmetro	Un.	PEWTER	PRESTIGE	BRAEMAR	ESTEREL	COMPOSTO
		89126745	89126866	89126974	89126913	89126992
Extracto (p/p) - Mosto	%P	15,78	15,93	15,83	15,04	15,11
Extracto (p/v) - Mosto	%(p/v)	16,77	16,94	16,82	15,93	16,01
pH - Mosto		4,89	4,86	5,13	5,02	4,97
Coloração - Mosto	EBC	7,6	6,3	10,5	7,7	7,1
Amargor - Mosto	U.A.	38	36	39	39	36
Extracto Aparente Limite	%(p/v)	2	2,64	2,56	1,99	2,02
Atenuação Real Limite	%	71,3	68,4	68,7	70,9	70,8
FAN Malte (LT375)	mg/100g	136,2	112	153	139	135,7
Beta-Glucanas	mg/l			<20	220	<20
Poder Tampão	ml			7,87	6,752	6,515
FAN Mosto	mg/l	222	189	246	207	207

A caracterização dos aminoácidos em cada tipo de mosto foi entregue a um laboratório externo pertencente à Carlsberg, Breweries SA. Os resultados obtidos permitem comparar as variações de concentração de cada aminoácido individualmente em cada mosto do sub-lote, que são monovarietais.

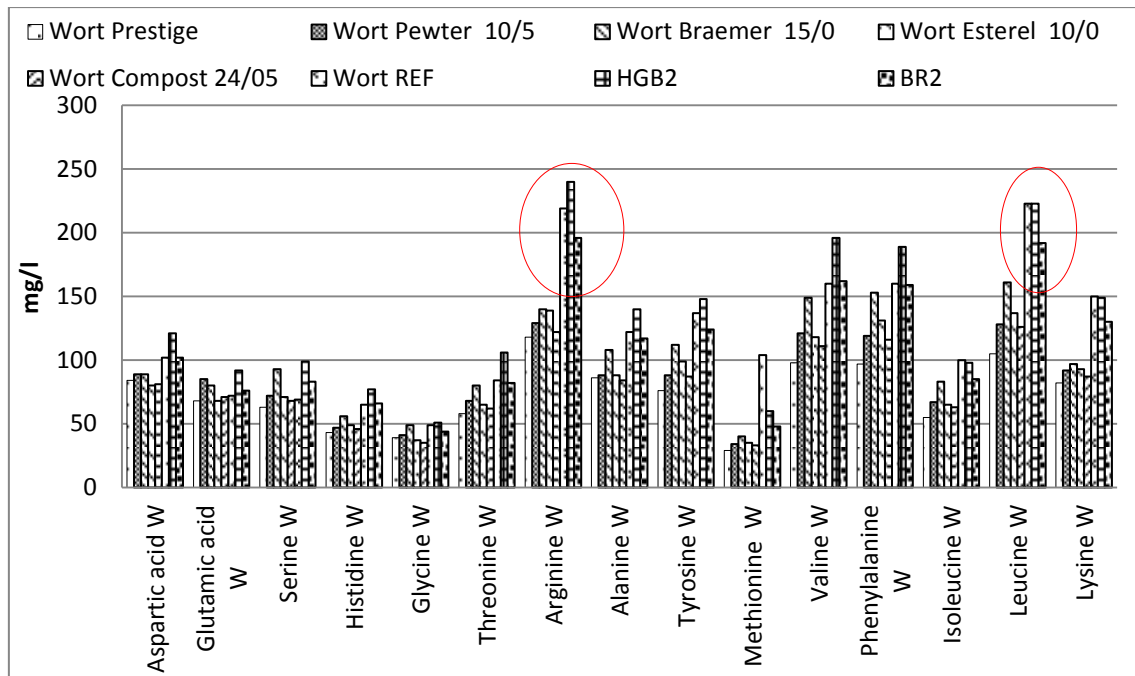


Gráfico 20 - Concentração de aa de cada tipo de mosto.

Como é possível verificar da análise do gráfico, os maiores picos correspondem à arginina e à leucina nos mostos referência, HGB2 e BR2. A concentração destes aminoácidos nestes mostos é muito elevada quando comparada com a concentração verificada nos mostos monovarietais. O mosto HGB2 é o mosto utilizado para a realizar fermentação através de *High Gravity Brewing*, e verifica-se que este mosto foi aditivado com *yeastex*.

O mosto referência é um mosto que revelou fornecer à levedura os nutrientes necessários, tendo-se verificado que esta teve um excelente desempenho fermentativo, por este motivo este mosto serve de *standard* no gráfico 21.

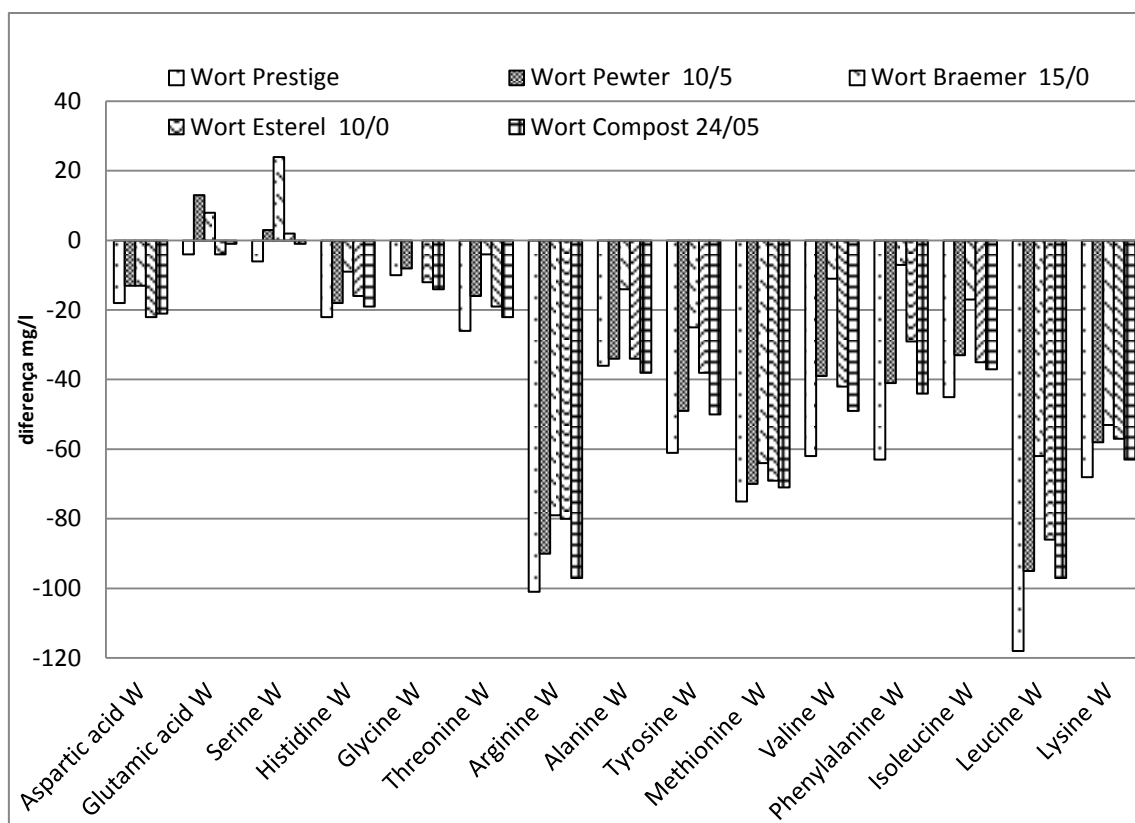


Gráfico 21 - Diferença entre a concentração de aa dos lotes estudados e o mosto industrial.

Verifica-se que a maioria dos aminoácidos analisados apresentam valores de concentração inferiores nos mostos monovarietais do que no mosto referência. As exceções são o ácido glutâmico, nos mostos Pewter e Braemar e a serina, nos mostos Esterel, Braemar e Pewter.

A tabela 6 mostra o agrupamento que pode ser feito por classes de aminoácidos. Graficamente, a comparação entre a concentração dessas classes em cada mosto é representada no gráfico 22.

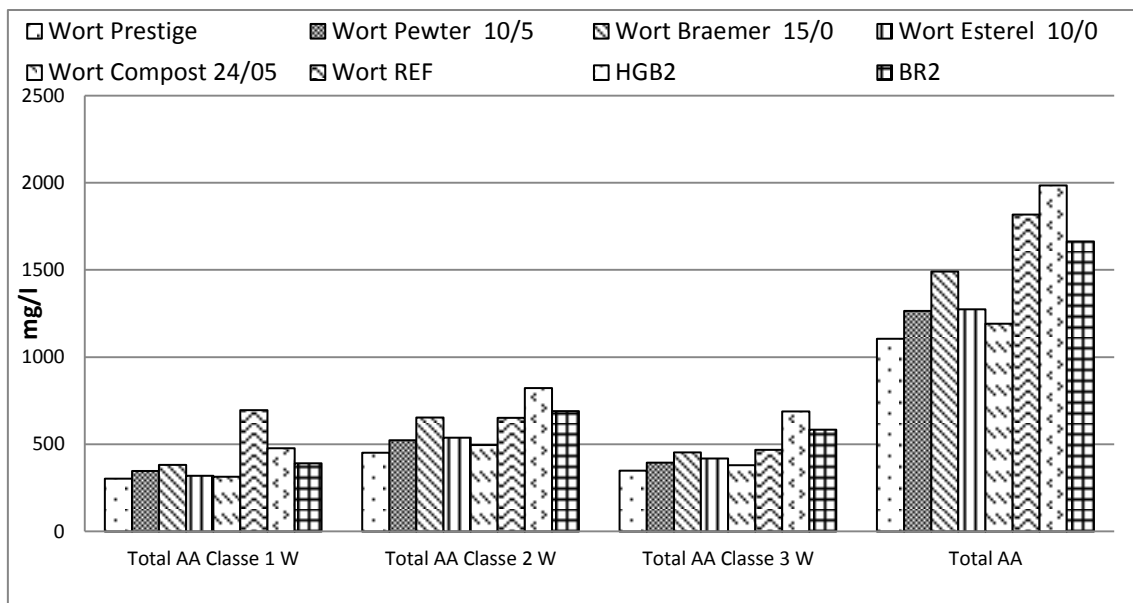


Gráfico 22 - Concentração dos grupos de aa e aa-totais para cada tipo de mosto.

Como é possível verificar no gráfico anterior, a classe que apresenta a maior concentração de aminoácidos é a classe 2. O tipo de mosto que possui a maior concentração de aminoácidos totais é o mosto HGB2, que, tal como foi dito, foi aditivado.

O gráfico 23 representa as variações de classe de aminoácidos por cada fabrico de mosto.

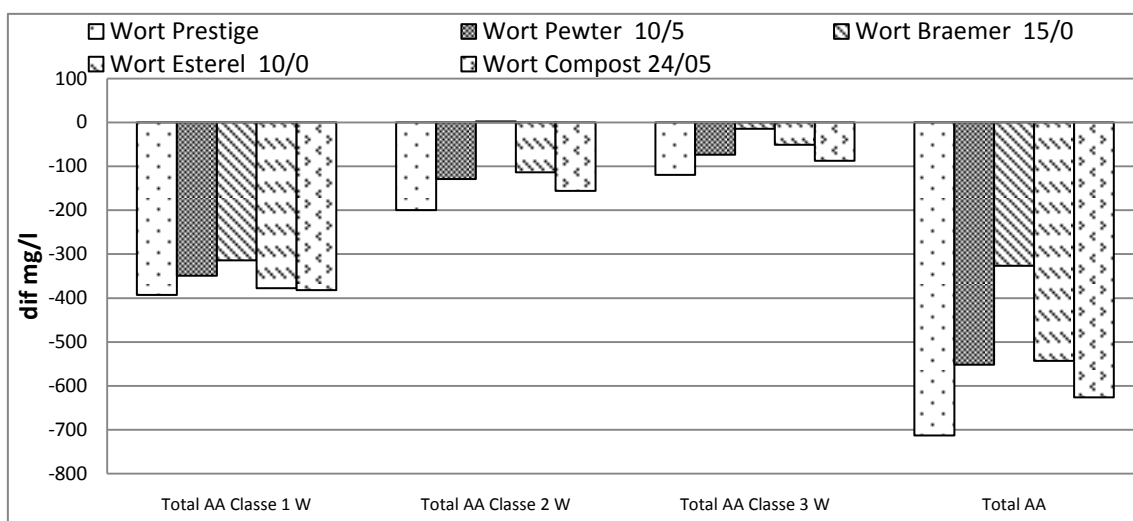


Gráfico 23 - Diferença das classes de aminoácidos entre os lotes estudados e o mosto industrial.

O mosto industrial, quando comparado com os restantes mostos, possui maior concentração de aminoácidos de todas as classes. A única exceção é o mosto Braemar que possui uma concentração de aminoácidos de classe 2 ligeiramente superior. O mosto que apresenta uma maior diferença para o mosto industrial é, como se pode verificar, o mosto Prestige.

Os gráficos 24 e 25 ilustram as diferenças entre o mosto composto, os mostos monovarietais e o mosto referência. Tal como já tinha sido verificado anteriormente, o mosto referência apresenta a maior concentração de aminoácidos, destacando-se a arginina e a leucina como os aminoácidos presentes em maior concentração.

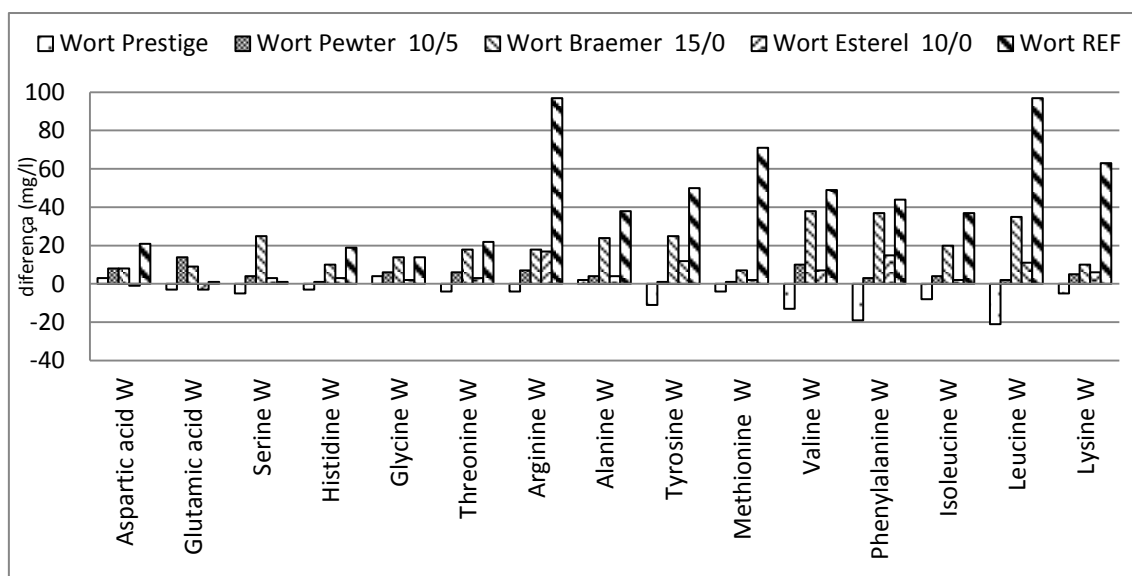


Gráfico 24 - Diferença da concentração de aa entre os sub-lotes e o mosto composto.

Como é possível verificar no gráfico, a maior diferença positiva para o mosto composto é, a seguir ao mosto referência, o mosto Braemar, que possui a maior diferença de concentração em treze dos quinze aminoácidos analisados. Em contraste com o verificado para o mosto Braemar, o mosto Prestige apresenta a maior diferença negativa relativamente ao mosto composto. Desta forma, o mosto Prestige é o mosto com menor concentração de aminoácidos em doze dos quinze analisados neste gráfico, verificando-se também que apenas três dos quinze apresentam uma diferença positiva.

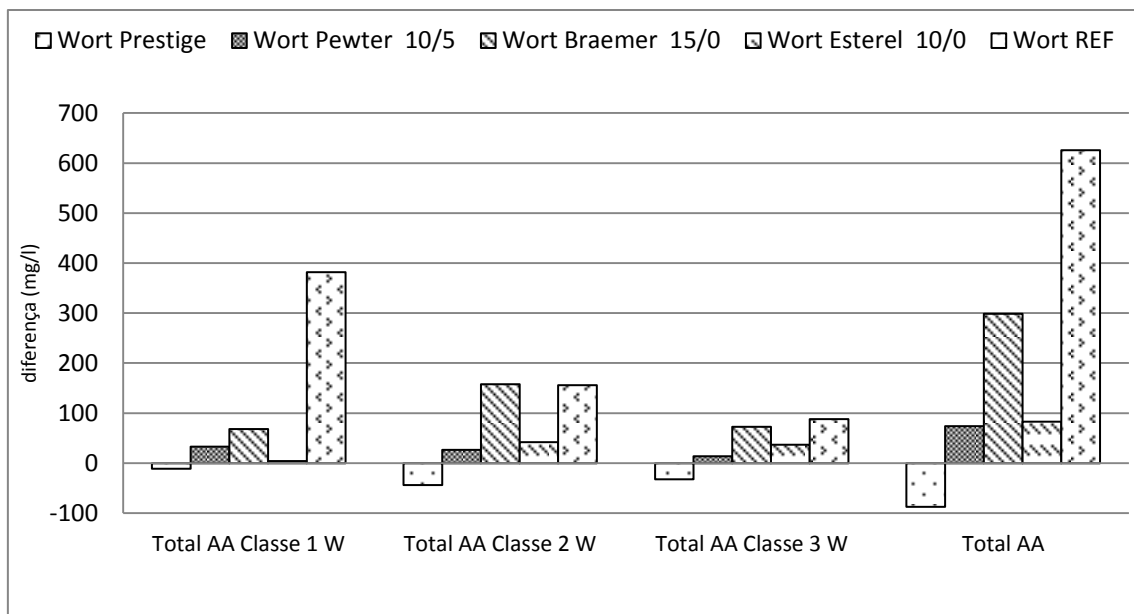


Gráfico 25 - Diferença de aa da mesma classe entre os sub-lotes e o mosto composto.

O gráfico 25 demonstra homologia com o verificado no gráfico 24, isto é, apesar do agrupamento por classes dos aminoácidos o mosto Prestige continua a apresentar valores de concentração inferiores, enquanto os mostos referência e Braemar continuam a apresentar os maiores valores de aminoácidos. Este resultado mostra que existe consistência na forma como os aminoácidos são absorvidos, não se verificando que algum malte possua um pico quando se soma as concentrações de aminoácidos de uma determinada classe.

As análises de FAN do malte e do mosto são apresentadas no gráfico 26.

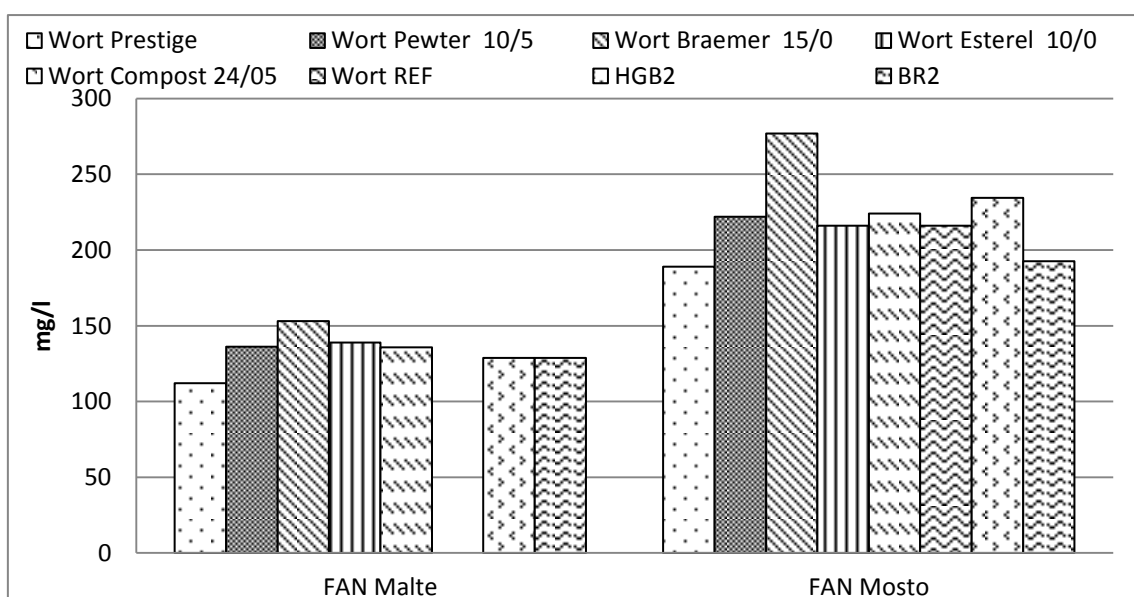


Gráfico 26 - Comparação do FAN dos mostos e dos maltes em análise.

A análise do gráfico anterior permite verificar que o FAN do mosto é superior ao FAN do malte. Dadas as características da produção de mosto este resultado é esperado e transmite o efeito de reacções enzimáticas entre outras.

De modo a estabelecer uma relação entre o malte e o mosto correspondente, foi analisado o FAN e verificado se existia algum tipo de correlação linear com a concentração de aminoácidos total, no gráfico 27, e com o FAN do malte no gráfico 28.

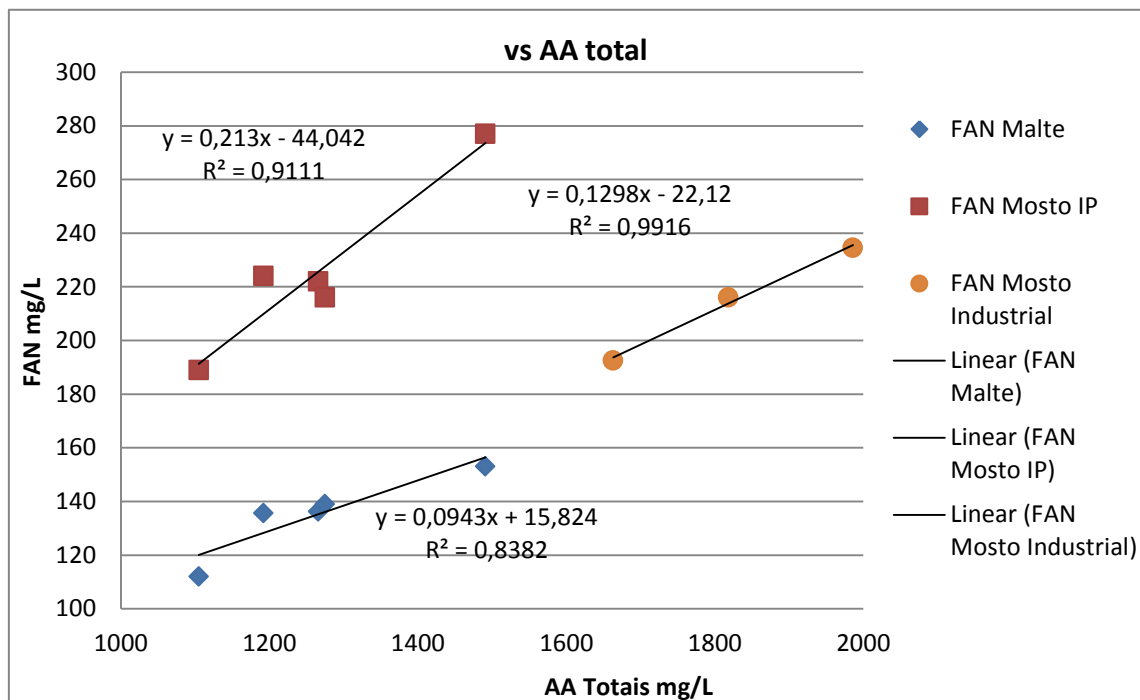


Gráfico 27 - Correlação entre os resultados de FAN e os valores de aminoácidos totais.

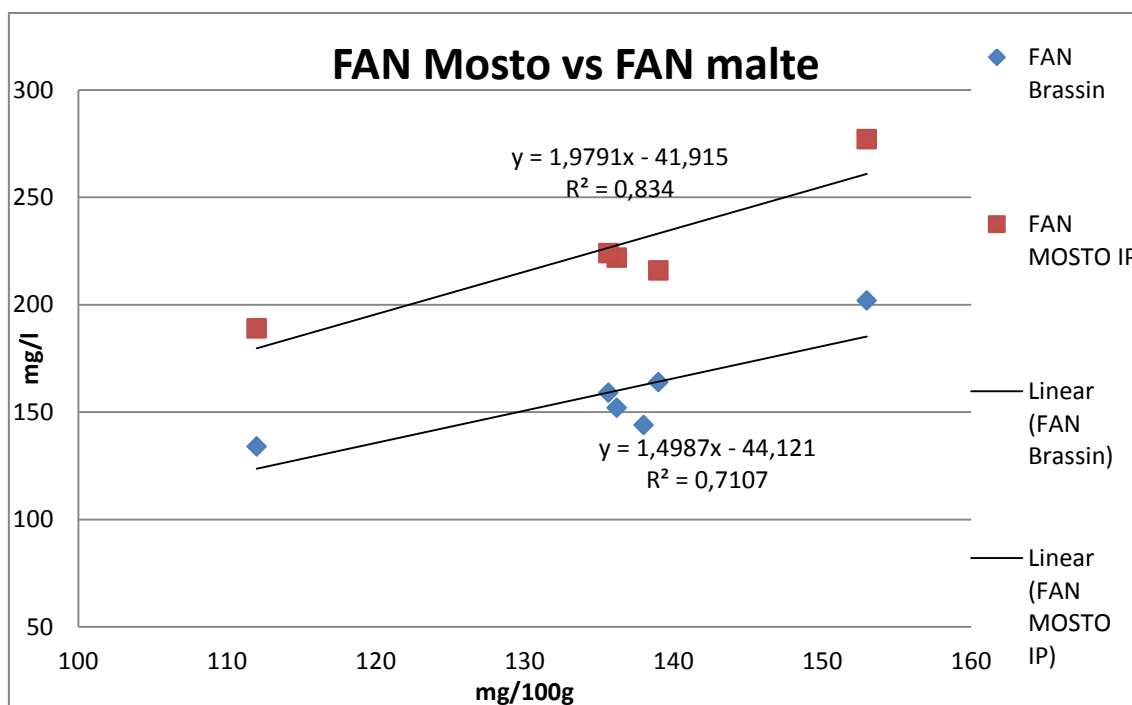


Gráfico 21 - Correlação entre resultados de FAN de mosto e brassin em relação ao FAN do malte que lhes deu origem.

No gráfico 28 verifica-se que existe uma correlação entre o valor de FAN e aminoácidos totais para os mostos dos sub-lotes. É possível realizar esta afirmação pois verifica-se um elevado factor de correlação linear. O factor de correlação entre o FAN do malte e os aminoácidos totais é menor do que o obtido em nos mostos dos sub-lotes. Relativamente aos mostos industriais verifica-se que existe uma relação entre os três pontos, no entanto, existe uma discussão no grupo de trabalho relativamente à relevância científica destes resultados.

A caracterização da concentração de iões nos mostos produzidos foi, tal como o perfil de aminoácidos, atribuída ao laboratório da Carlsberg. O gráfico 29 ilustra os resultados obtidos.

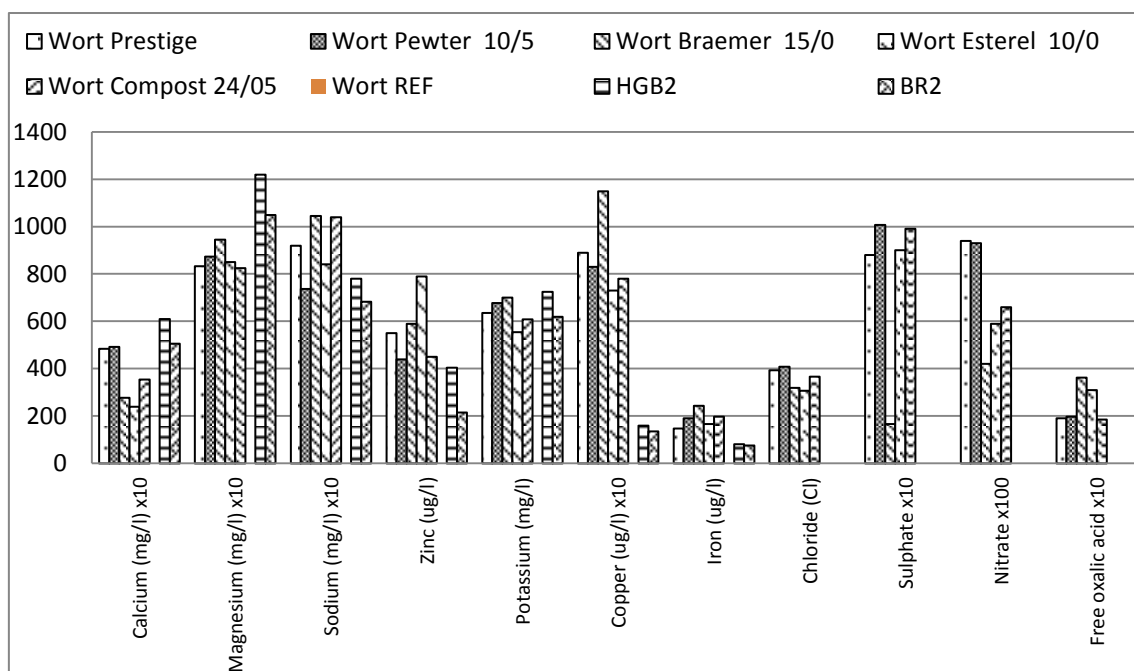


Gráfico 29 - Concentração de íons para cada tipo de mosto.

Neste gráfico verifica-se que de todos os íons analisados aqueles que se apresentam em menor concentração são o cálcio e o ácido oxálico livre. Por outro lado, o zinco, o potássio e o cloro apresentam-se como os íons em maior concentração.

A comparação entre os íons dos vários mostos monovarietais e o mosto industrial é dada no gráfico 30.

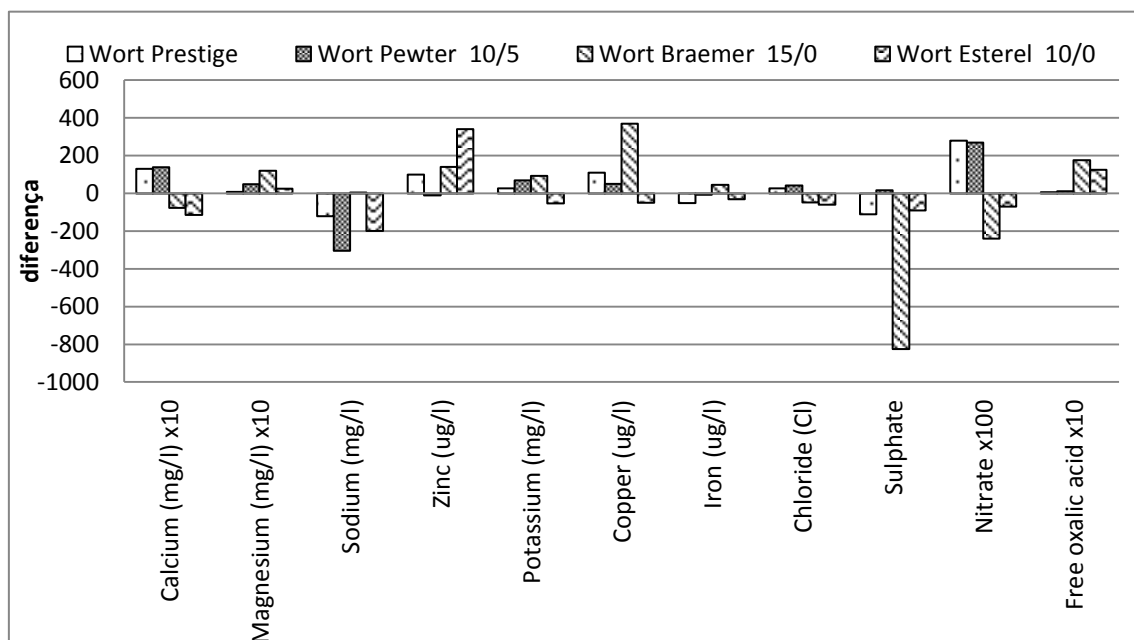


Gráfico 30 - Diferença da concentração de íons entre os sub-lotes e o mosto composto.

A análise do gráfico 30 mostra que não existem diferenças muito pronunciadas de concentração de iões entre os mostos monovarietais e o mosto composto. Verifica-se, no entanto, que a concentração do ião sulfato no mosto Braemar é inferior em cerca de 800mg/L ao mosto composto, o que contrasta com a concentração do ião cobre no mesmo mosto, que é aproximadamente 400mg/L superior.

Para avaliar a relação entre as análises aos maltes e mostos e o desempenho das fermentações serão realizadas fermentações em tubos EBC. Os tubos EBC são fermentadores cilíndricos com 2L de volume útil e que possuem um sistema de controlo de temperatura. As fermentações serão realizadas em triplicado com os mostos IP produzidos anteriormente e já analisados relativamente ao conteúdo em azoto e iões.

Apreciação Final

O estágio realizado na Unicer foi das experiências mais gratificantes em que participei. A aplicação dos conhecimentos adquiridos no decorrer de toda a minha vida académica foi um repto à minha capacidade de adaptação ao mundo do trabalho, sendo por este motivo muito gratificante ter participado em tal experiência.

De salientar que considero uma honra ter desenvolvido e participado num estudo, em que os resultados obtidos se tenham repercutido no seu expoente máximo, ou seja, a sua aplicação industrial.

De todos os restantes estudos em desenvolvimento, reitero a minha ambição para a sua melhor aplicação e espero que venham a ter o maior sucesso.

Referências Bibliográficas

1. Arnold, John P. (2005). Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology. *Reprint Edition by BeerBooks*, Cleveland, OH.
2. Pattinson, Ron. 2006. European Beer Statistics: Volume of World Beer Production. Em: European Beer Guide: europeanbeerguide.net/eustats.htm#production.
3. Nelson, Max. 2005. The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe. Routledge, New York, NY.
4. Goldammer, Ted. 1999. The Brewers Handbook. Chapter 6 - Adjuncts. KVP Publishers, Clifton, VA.
5. Stephenson, W. H., & Bamforth, C. W. (2002). The impact of lightstruck and stale character in beers on their perceived quality: A consumer study. *Journal of the institute of Brewing*, 108, 406-409.
6. Dalgliesh, C. E. (1977). Flavour Stability. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 623-659.
7. Meilgaard, M. C. (1975a). Flavor chemistry of beer; Part I: flavor interaction between principal volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12, 107-117.
8. Vanderhaegen, B., Neven, W., Verachtert, H., Derdelinckx, G., *The chemistry of beer aging - a critical review*, Food Chemistry, Volume 95, Issue 3, April 2006, Pages 357-38.

9. Horn, C. S., Franke, M., Blakemore, F. B. (1997) *Modeling and simulation of pasteurization and staling effects during tunnel pasteurization of bottled beer*
10. Kaneda, H., Kano, Y., Kamimura, M., Osawa, T. and Kawakishi, S., (1990), *Evaluation of beer deterioration by chemiluminescence*, J Food Sci, 55: 1361.
- ¹1. Getranke-Fachverlag H. C. (1995) E.B.C., *Beer Pasteurization (Manual of Good Practice)*.
12. Derdelinckx, W. (1990) *Microbiologie de la Brasserie*, Université Catholique de Louvain e Universidade Católica Portuguesa.
13. Kunze, W. (1999) *Technology Brewing and Malting*. Tradução inglesa da 7ª edição de *Technologie Brauer und Malzer*. 2ª Edição, VLB Berlin
14. Del Vecchio, H. W., Dayharsh, C. A. and Baselt, F. C., (1951), *Thermal death time studies on beer spoilage organisms*, Am Soc Brew Chem,Proc., 45.
15. Sakamoto, K, Konings, W., *Beer spoilage bacteria and hop resistance*, International Journal of Food Microbiology, Volume 89, Issues 2-3, 31 December 2003, Pages 105-124
16. Rigby, F.L. and J.L. Bethune, Components of the Lead-precipitable Fraction of Humulus lupulus. Adhumulone. Journal of the American Chemical Society, 1955. 77(10): p. 2828-2830.
17. Bamforth, C. (2006) *Beer: a quality perspective - Handbook of alcoholic beverages series*.

18. Buzrul, S., *High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review*, Innovative Food Science and Emerging Technologies (2011), doi: 10.1016/j.ifset.2011.10.001

19. Analytica _ EBC - 9.2.6 - *Alcohol in beer by near Infrared Spectroscopy*. Dec 2008


20. Boulton, C., Quain, D., (2006), *Brewing Yeast and Fermentation*, John Wiley & Sons

Anexos

Organism	D ₆₀ -value (min)	Z-value (°C)	Reference
Brewer's yeast	0.00038*)	4	based on data from Röcken (1984) & Bruner (1953)
Wild yeast	0.0060*)	4	
S. globosus	0.076*)	5	
S. cerevisiae var. ellipsoideus	0.00095*)	4	
Lactobacillus sp	0.024*	3	
Pediococcus sp	0.00073*)	4	
Lactobacillus heterofermentative			
Strain A	2.1	7.5	Ohkochi & Takahashi (1982)
Strain B	3.8	8.3	
Strain D	3.5	7.6	
Strain E	4.3	4.4	
Strain F	3.9	5.8	
Strain G	4.4	8.0	
Strain H	0.068	6.9	
Strain I	0.062	6.6	
Strain J	0.15	8.6	
Strain K	0.042	5.2	
Hansenula anomala	0.0039	4.6	
Pichia membranaefaciens	0.00025	2.8	Tsang & Ingledew (1982)
S. carlsbergensis	0.004	4.4	
Lactobacillus frigidus	0.44	15	
Pediococcus acidilactici	0.87	11	
L. delbrueckii	0.091	12	
Saccharomyces strain XY66 (wild yeast)			
Veg. cells in beer	0.24	8.0	Kilgour & Smith (1985)
Veg. cells in AFB ¹⁾	0.53	5.5	
Spores in beer	2.9	6.9	
Spores in AFB ¹⁾	23	4.1	







*) Calculated from D₅₀ and D₅₅ values respectively.
1) Alcohol Free Beer.












Anexo 1 - Valores de D₆₀ e Z para alguns organismos nocivos à cerveja e algumas espécies de leveduras fermentativas.




				TERMINOLOGIA RECOMENDADA PELO EBC E ASB PARA DESCREVER IMPRESSÕES DE AROMA/GOSTO				RELATIVO:				FUC009.02				
								0 = AROMA: T = GOSTO M = IMPRESSÃO NA BOCA W = REQUENTADO, A1 = "Arrière-gout"								
																
2000 AROMA																
2009 Aromausulfiadete				0 3	CEREAIS		02	ENXOFRE		10	DOCE					
2100 Especiarias				OTW	0310 A GRÃOS	OT	0700 A ENXOFRE	OT	1000	DOCE						
2106 Baunilha				OTW	0311 A casca / fibra celulose	OT	0710 SULFÍTICO	OT			1001 A mel	OT				
2107 Cravo da Índia				OTW	0312 A griz de milho	OT	0720 SULFIDRICO	OT			1002 A compota	OT				
2108 Canela				OT	0313 A farinha	OT	0721 H2S	OT			1003 Baunilha	OT				
2120 QUÍMICO				OT	0320 A MALTE	OT	0722 Mercaptans	OT			1004 "Primings"	OT				
2121 Plástico				OT	0330 A MOSTO	OT	0723 A alho	OT			1005 Xarope	OTM				
2122 Sintético				OT			0724 Luz	OT			1006 Demasiado doce	OT				
2123 A catalidado				OT	04	CARAMELIZADO, TORRADO, GRELHADO		0725 Autólise	OT							
2124 Hidrocarbonetos				OT	0410 CARAMELO	OT	0726 Borracha queimada	OT	11	SALGADO						
2125 Veniz				OT	0411 Melão	OT	0727 A canela	OT								
2140 FRUTOS ESTRANHOS AO PRODUTO				OT	0412 Alcaçuz	OT	0729 Cebola	OT	1100	SALGADO						
2142 Maçã				OT	0421 Crosta de pão	OT	0730 LEGUMES COZIDOS	OT								
2143 Banana				OT	0422 Cevada torrada	OTM	0731 Alpo	OT								
2144 Groselha preta				OT	0423 A lúpulo	OT	0732 DMS	OT	12	AMARGO						
2145 Melão				OT			0733 Couves cozidas	OT								
2146 Pera				OT			0734 Milho doce cozido	OT	1200	AMARGO						
2147 Framboesa				OT			0735 Tomate cozido	OT			1201 Enxafiado amargo	TAI				
2148 Morango				OT	05	ENÓLICO	OT	0736 Cebola cozida	OT		1202 Insuficiente amargo	TAI				
2149 Amêndoas				OT			0740 LEVEDURA	OT			1218 Duro, aspero	TAI				
2151 Damasco				OT	0500 FENÓLICO	OT	0741 A carne	OT			1219 "Arrière-gout"	TAI				
2152 Pêssego				OT	0501 Alcatrão	OT										
2153 Toranja				OT	0502 Bakelite	OT	08	ENVELHECIDO, OXIDADO, AMOEBO		13	SENSAÇÃO NA BOCA					
2154 Tangerina				OT	0503 A fénico	OT										
2155 Lima				OT	0504 Cloroformol	OT	0800 ENVELHECIDA	OTM	1310 ALCALINO	TMAT						
2156 Limão				OT	0505 Iodoformol	OT	0810 A GATO	OTM	1320 "MOLEUX"	MAI						
2157 Laranja				OT	0509 Medicinal	OT	0820 A PAPEL	OTM	1330 METÁLICO	OTMAI						
2160 FLORES				OT			0826 Oxidada	OT	1340 ADSTRINGENTE	MAI						
2163 Perfume				OT	06	SABÃO, GORDURA, DIACETILO, ÓLEO, RANÇO		0828 A pão	OT	1341 Secco	MAI					
2180 FRESCO				OT			0829 Sobrepasteurizado	OT	1350 A PÓ	OTM						
2190 SINTÉTICO				OT	0610 ÁCIDOS GORDOS	OT	0830 A COURO	OTM	1360 CARBONATAÇÃO	M						
2191 Refugado				OT	0611 Caprílico	OT	0840 A MOFO	OT			1361 Carbonatação insuficiente	M				
2192 Essências				OT	0612 Queijo	OT	0841 A terra	OT			1362 Sobrecarbonatado	M				
2193 Casca fruta				OT	0613 Isovalérico	OT	0842 A bolores	OT	1370 REQUENTADO	WMAI						
2200 RESINA, NOZES, VERDURA, ERVAS					0614 Butírico	OT										
					0619 Sabão	OT	09	ÁCIDO, ACRE		14	DOURO					
2210 RESINA				OT	0620 DIACETILO	OT										
2211 Mata-eira				OT	0630 RANÇO	OT	0900 ÁCIDO	OT	1410 COURO	OTM						
2220 NOZES				OT	0631 Óleo rançoso	OTM	0910 ACÉTICO	OT			1411 Aguado	TMAT				
2221 Noz				OT	0639 A cera	OTM	0920 ACRE	OT			1412 Sem características	OTM				
2222 Noz de Coko				OT	0640 A ÓLEO	OTM					1413 Que enfiaria	OTM				
2223 Favas				OT	0641 Óleo vegetal	OTM					1414 Encorpado (espesso)	TMAT				
2224 Amêndoas				OT	0642 Óleo mineral	OTM					1417 A agradável	OT				
0230 ERVAS				OT							1478 Equilibrado	OT				
0231 Erva recentemente cortada				OT							1479 Desajustilibrada	OT				
0232 Tipo palha				OT						1480 INCARACTERIZÁVEL	OTMAI					

Anexo 2 - tabela com a terminologia recomendada pela EBC para descrever sensações de aroma/gosto

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0111	Especiarias	Tapar / agitar copo Longos 'Sniff'	Spicy Especiarias
	0130	Butirato de etilo	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Frutos Tropicais Ananás
	0131	Acetato de isoamilo	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Isoamyl acetate Banana
	0132	Hexanoato de etilo	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Ethyl hexanoate Maçã / Anis
	0150	Acetaldeído	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Acetaldehyde Maçã verde / Maçã esmagada / Solvente
	0162	Geraniol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Geraniol Rosas / Flores
	0171	Lúpulo em caldeira	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Kettle hop Lupulagem tardia Especiarias
	0173	Óleo de lúpulo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Hop oil Lúpulo
	0224	Amêndoa	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Almond Massapan / Amêndoas Amargas
	0231	Erva	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Freshly cut grass Relva cortada de fresco Folhas verdes esmagadas
	0310	Grãos	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Grainy Malte 'verde' / Áspero
	0423	Fumado	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Smoky Fumo / Bacon fumado / Carne fumada

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0500	Fenólico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Phenolic Especiarias - cravinho Herbal / Alho
	####	Bromofenol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Bromophenol Iodo / Curto Circuito / TV
	0504	Clorofenol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Chlorophenol Antisséptico / Hospital
	0611	Caprílico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Caprylic Queijo de cabra
	0613	Isovalerico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Isovaleric Lúpulos velhos / Queijo Suor / Chulé
	0614	Butírico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Butyric Vômito de bebé
	0620	Diacetilo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Diacetyl Manteiga rançosa
	0710	Sulfítico	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Sulphitic Dióxido de enxofre Fósforos queimados
	0721	H ₂ S	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	H ₂ S Ovos podres / Sulfídrico
	0722	Mercaptano	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Mercaptan Esgoto / Lixo / Vegetais podres
	0724	Luz	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Lightstruck Doninha
	0732	DMS	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	DMS Milho cozido / Vegetais cozidos

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0736	Cebola	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Onion Cebola cozida / Tipo alho
	0810	Gato	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Catty Urina gato
	0820	Papel	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Papery Cartão / Oxidado
	830	Couro	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Leathery Couro
	0841	Terra	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Earthy Terra húmida
	0842	Mofo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Musty - bolores Cave húmida / Mofo
	0910	Acético	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's'	Acetic Vinagre
	0920	Ácido	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Sour - Acre Acidez do limão
	930	Láctico	Tapar / agitar copo Longos 'Sniff's' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	
	1003	Baunilha	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniff's' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Vanilla Leite creme Creme de nata / Gelado
	####	Indol	Tapar / agitar copo Longos 'Sniff's'	Indole Fralda de Bebê / Fezes

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	1100	Sal	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Salty Sal
	1310	Alcalino	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Alkaline Detergente alcalino / Cáustico
	1330	Metálico	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Metallic Ferro / Sangue

Anexo 3 – Tabelas com a terminologia simplificada para descrever as sensações de aroma/gosto.

[illegible]

- +1 Produto de óptima qualidade
- 0 Normal para este tipo de produto
- 1 Com defeitos aceitáveis p/ este tipo de produto
- 2 Com defeitos não aceitáveis p/ este tipo de produto
- 3 Com defeitos tão graves que requerem acção imediata

1 Ligeiro
2 Moderado
3 Forte

Data _____

Anexo 4 - Boletim de análise sensorial / controlo organoléptico a preencher pelo
provedor.

TESTE TRIANGULAR

Série Nº:

Produto:

São-lhe apresentadas 3 amostras.

Faça um círculo na amostra que é diferente das outras duas.

3 Amostras - (nº / código)

_____ - _____ - _____

Qual das amostras prefere? _____

Porquê? _____

Comentários: _____

Série Nº:

Produto:

São-lhe apresentadas 3 amostras.

Faça um círculo na amostra que é diferente das outras duas.

3 Amostras - (nº / código)

_____ - _____ - _____

Qual das amostras prefere? _____

Porquê? _____

Comentários: _____

Assinatura _____

Nº Mecn. _____

Data _____